



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](#).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**“VIRULENCIA DE UNA CEPA NATIVA DE *Beauveria bassiana* SOBRE UN CRISOMÉLIDO FITÓFAGO (*Syphrea* sp) DEL CULTIVO DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) EN CONDICIONES DE VIVERO”**

**Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo**

**AUTOR:**

**Bach. Marilyn Rimachi Valle**

**ASESOR:**

**Dr. Agustín Cerna Mendoza**

**TARAPOTO - PERÚ**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**“VIRULENCIA DE UNA CEPA NATIVA DE *Beauveria bassiana* SOBRE UN CRISOMÉLIDO FITÓFAGO (*Syphrea* sp) DEL CULTIVO DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) EN CONDICIONES DE VIVERO”**

**Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo**

**AUTOR:**

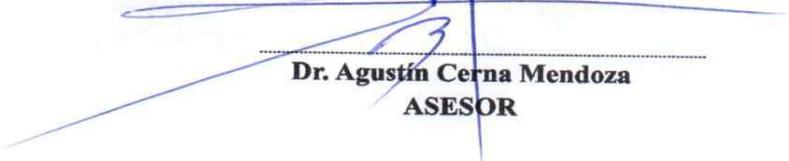
**Bach. Marilyn Rimachi Valle**

**Sustentada y aprobada el día 03 de octubre del 2018, ante el honorable jurado:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Winston Franz Ríos Ruiz**  
**PRESIDENTE**

  
\_\_\_\_\_  
**Ing. M. Sc. Manuel Santiago Doria Bolaños**  
**SECRETARIO**

  
\_\_\_\_\_  
**Ing. Eybis José Flores García**  
**MIEMBRO**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Agustín Cerna Mendoza**  
**ASESOR**

## Declaración de Autenticidad

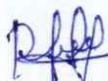
Yo, MARILYN RIMACHI VALLE, egresado(a) de la Facultad de CIENCIAS AGRARIAS de la Escuela Profesional de AGRONOMÍA, de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, identificado con DNI N° 76666961, Domiciliado en: Jr. Pachacutec N° 205 - Lamas, con la tesis titulada: “VIRULENCIA DE UNA CEPA NATIVA DE *Beauveria bassiana* SOBRE UN CRISOMÉLIDO FITÓFAGO (*Syphrea* sp) DEL CULTIVO DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) EN CONDICIONES DE VIVERO”.

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), falsificación (al presentar la información e ideas de otras personas de forma falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiénndose a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 03 de Octubre del 2018



MARILYN RIMACHI VALLE

DNI N° 76666961



**Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis**

**1. Datos del autor:**

Apellidos y nombres: RIMACHI JALIE MARILYN	
Código de alumno : 121129	Teléfono: 945723363
Correo electrónico : rimachimanlyn@gmail.com	DNI: 76666961

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

**2. Datos Académicos**

Facultad de: CIENCIAS AGRARIAS
Escuela Profesional de: AGRONOMÍA

**3. Tipo de trabajo de investigación**

Tesis	( X )	Trabajo de investigación	( )
Trabajo de suficiencia profesional	( )		

**4. Datos de trabajo de investigación**

Título: "VIRULENCIA DE UNA CEPA NATIVA DE Beauveria bassiana SOBRE UN CRISOMÉLIDO FITÓFAGO (Syrphia sp) DEL CULTIVO DE SACHA INCHI (Plukenetia volubilis L.) EN CONDICIONES DE VIVERO"
Año de publicación: 2018

**5. Tipo de Acceso al documento**

Acceso público *	( X )	Embargo	( )
Acceso restringido **	( )		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indiquen el sustento correspondiente:


**6. Originalidad del archivo digital**

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el Título Profesional o Grado Académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el jurado.

**7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS***

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el Inciso 12.2, del Artículo 12° del Reglamento Nacional de Trabajos de Investigaciones para optar Grados Académicos y Títulos Profesionales –RENATI “**Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA**”.

.....  
Firma del Autor

**8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM-T.**

Fecha de recepción del documento:

22/11/2018



.....  
Firma del Responsable de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM-T.

**\*Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

**\*\*Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Rita Aurora y José Ramiro, por el apoyo incondicional que me brindan día a día, a mis hermanos Ehisten, Lleysi y a mi novio Roger Hader por la confianza y motivación constante para salir adelante en mi vida profesional.

Al personal que labora en el IIAP- Laboratorio de Fitopatología, por las enseñanzas y motivación brindada en este tramo de mi formación.

Marilyn.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia por el apoyo económico y moral, para la realización de mis metas.

Al Instituto de la Amazonía Peruana (IIAP) - Tarapoto y al Proyecto Sacha Inchi -Drasam, por brindarme las instalaciones del laboratorio y el financiamiento para ejecutar el presente trabajo de investigación. A mi co- asesor Ing. Jaime Cayotopa Torres, encargado del área de Fitopatología – IIAP-SM, por incentivar-me a realizar este trabajo de investigación, por confiar en mis capacidades, y direccionarme durante la tesis; al Tec. Delmar A. Cayotopa Olivera, por el apoyo constante en las pruebas realizadas en laboratorio, por escucharme y aconsejarme siempre.

A mi asesor, Dr. Agustín Cerna Mendoza, por el apoyo moral y científico brindado para la culminación del trabajo de investigación.

A mi mejor amigo y novio Ing. Roger Pichis García, por su paciencia, por su infinito apoyo y el asesoramiento en el procesamiento de datos estadísticos.

Marilyn.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Cultivo de Sacha Inchi ( <i>Plukenetia volubilis</i> L.).....	3
1.1.1. Antecedentes.....	3
1.1.2. Descripción botánica.....	3
1.2. <i>Syphrea</i> sp (Chrysomelidae: Alticini).....	4
1.2.1. Características morfológicas de <i>Syphrea</i> sp.....	4
1.2.2. Bioecología de <i>Syphrea</i> sp.....	5
1.3. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.....	6
1.3.1. Descripción morfológica.....	7
1.3.2. Mecanismos de acción de <i>B. bassiana</i> .....	8
1.3.3. Modo de infección.....	11
1.3.4. Influencia de los factores ambientales sobre <i>B. bassiana</i> .....	12
1.3.5. Rango de hospederos de <i>B. bassiana</i> .....	13
1.3.5.1. Experiencias regionales de trabajos con <i>Beauveria bassiana</i> .....	15
1.4. Producción de hongos entomopatógenos.....	16

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
2.1. Método de la investigación.....	18
2.2. Variables o Características evaluadas.....	31
2.3. Diseño de la investigación.....	33
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
3.1. Resultados y Discusiones .....	34
3.1.1. Control de Calidad.....	34
3.1.2. Porcentaje de mortalidad .....	35
3.1.3. Tiempo Letal 50 de mortalidad (TL <sub>50</sub> ) .....	36
3.1.4. Tiempo Letal 90 de mortalidad (TL <sub>90</sub> ) .....	37
3.1.5. Tiempo de aparición del micelio .....	38
Conclusiones.....	41
Recomendaciones .....	42
Revisión Bibliográfica.....	43
Anexos .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Control de calidad de <i>Beauveria bassiana</i> en sustrato de arroz.....	34
<b>TABLA 2.</b> ANVA para el porcentaje de mortalidad de <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria bassiana</i> .....	35
<b>TABLA 3.</b> ANVA para el Tiempo Letal 50 de mortalidad de <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria bassiana</i> , expresado en días .....	36
<b>TABLA 4.</b> ANVA para el Tiempo Letal 90 de mortalidad de <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria bassiana</i> , expresado en días .....	37
<b>TABLA 5.</b> ANVA para el Tiempo de aparición del micelio sobre <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria bassiana</i> , expresado en días .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Laboratorio de Fitopatología.....	18
<b>Figura 2.</b> Textura y nivel de esporulación de <i>Syphrea</i> sp.....	18
<b>Figura 3.</b> Reactivación del inóculo de <i>B. bassiana</i> .....	19
<b>Figura 4.</b> Preparación de medio de cultivo PSA.....	20
<b>Figura 5.</b> Preparación del medio líquido .....	21
<b>Figura 6.</b> Secado del producto final.....	22
<b>Figura 7.</b> Cosecha del hongo entomopatógeno.....	23
<b>Figura 8.</b> Recuento directo de conidias .....	24
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de germinación .....	26
<b>Figura 10.</b> Pureza.....	27
<b>Figura 11.</b> Siembra de semillas de Sacha Inchi para alimentación de insectos.....	27
<b>Figura 12.</b> Colecta y adaptación de <i>Syphrea</i> sp.....	28
<b>Figura 13.</b> Formulaciones de concentraciones de esporas.....	29
<b>Figura 14.</b> Aplicación de <i>B. bassiana</i> a <i>Syphrea</i> sp en jaulas de aclimatación .....	29
<b>Figura 15.</b> Evaluación de mortalidad de <i>Syphrea</i> sp .....	30
<b>Figura 16.</b> Conservación de <i>B. bassiana</i> en Silica Gel.....	31
<b>Figura 17.</b> Conservación de <i>B. bassiana</i> en tubos con medio PSA.....	31
<b>Figura 18.</b> Observación de las etapas de infección.....	33
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de mortalidad de <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria bassiana</i> .	36
<b>Figura 20.</b> Tiempo Letal 50 de mortalidad de <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> .....	37
<b>Figura 21.</b> Tiempo Letal 90 de mortalidad de <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> .....	38
<b>Figura 22.</b> Tiempo de aparición del micelio sobre <i>Syphrea</i> sp inoculados con <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> .....	40

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Plantas defoliadas obtenidas de las jaulas de aclimatación de insectos adultos ..	51
<b>Anexo 2.</b> Datos obtenidos de las condiciones ambientales presentadas en el experimento....	
.....	51
<b>Anexo 3.</b> Metodología de multiplicación de hongos.....	51
<b>Anexo 4.</b> Sustratos de multiplicación de hongos .....	55
<b>Anexo 5.</b> Certificado de Identificación del hongo entomopatógeno nativo <i>Beauveria bassiana</i> .....	57
<b>Anexo 6.</b> Certificado de Identificación de Chrysomelidade: Alticini .....	58
<b>Anexo 7.</b> Certificado de Identificación de género y especie de Chrysomelidade: Alticini.	59

## RESUMEN

Los hongos entomopatógenos constituyen una alternativa en el manejo integrado de muchas plagas. El trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la virulencia de la cepa nativa de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., para uso potencial como agente de control biológico contra *Syphrea* sp (Coleoptera: Chrisomelidae: Alticini), plaga potencial en Sacha Inchi. La cepa nativa de *B. bassiana* utilizada fue aislada del mismo insecto trabajado en el experimento. La virulencia de la cepa se determinó sobre adultos de *Syphrea* sp capturados de campos de *Plukenetia volubilis* L. y aclimatados en laboratorio por (30) días, la reactivación de la cepa nativa se realizó en medio de cultivo Papa Sacarosa Agar (PSA) y su producción en sustrato de arroz. Se consideró cuatro tratamientos (T0, T1, T2 y T3) y tres repeticiones utilizando tres concentraciones  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  esporas g/ml y un T0 con ADE + Tween 20. Se evaluó la mortalidad expresada en relación con la concentración del inóculo, estimada mediante el Porcentaje de Mortalidad, Tiempo Letal 50 (TL<sub>50</sub>), Tiempo Letal 90 (TL<sub>90</sub>), y, Tiempo de aparición del micelio. Se registró los mejores resultados en el tratamiento 3, con mortalidad corregida por la fórmula de Abbot de (84,85%) a los (10) días, TL<sub>50</sub> en menor tiempo (6,3) días, TL<sub>90</sub> con el menor tiempo (10) días, y (1,2) días para la esporulación del hongo en cámaras húmedas, considerándose una alternativa promisoría para el control de *Syphrea* sp en *Plukenetia volubilis* L. al ser incorporado dentro de un plan de manejo integrado.

**Palabras clave:** Control biológico, entomopatógeno, *Syphrea*, *Beauveria bassiana*.

## ABSTRACT

Entomopathogenic fungi is an alternative in the integrated management of many pests. The objective of the following research work was to determine the virulence of the native strain of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., for potential use as a biological control agent against *Syphrea* sp (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticini), potential pest in Sacha Inchi. The native strain of *B. bassiana* used was isolated from the same insect studied in the experiment. The virulence of the strain was determined on adults of *Syphrea* sp captured from fields of *Plukenetia volubilis* L. and acclimated in laboratory for (30) days, the reactivation of the native strain was carried out in culture medium Papa Sacarosa Agar (PSA) and its production in rice substrate. Four treatments were considered (T0, T1, T2 and T3) and three repetitions using three concentrations  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^9$  spore g / ml and one T0 with ADE + Tween 20. The mortality expressed in relation to the inoculum concentration was evaluated. estimated by the Mortality Percentage, Lethal Time 50 (TL50), Lethal Time 90 (TL90), and, Mycelial appearance time. The best results were recorded in treatment 3, with mortality corrected by the Abbot formula of (84,85%) at (10) days, TL50 in less time (6,3) days, TL90 with the shortest time (10) days, and (1,2) days for the sporulation of the fungus in humid chambers, considering it a promising alternative for the control of *Syphrea* sp in *Plukenetia volubilis* L. when incorporated into an integrated management plan.

**Keywords:** Biological control, entomopathogen, *Syphrea*, *Beauveria bassiana*.



## INTRODUCCIÓN

El cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) debido a sus características nutritivas, proteínas, aminoácidos, su elevado contenido de ácidos grasos esenciales (ácido linolénico, linoleico y oleico, conocidos como omega 3; 6 y 9 respectivamente) y vitamina E, es un cultivo prominente para la región San Martín con importancia económica e industrial en el mercado local, nacional e internacional (Manco, 2006). Existe un claro potencial en la región para la siembra de sachá inchi de aproximadamente 2200 000 ha, las mismas que están distribuidas en las diferentes provincias. En la actualidad, existen alrededor de 1 743 ha en producción; y 1 508 ha sembradas (Drasam, 2017).

El incremento del Sacha Inchi como monocultivo ha generado el aumento sorprendente de las poblaciones de artrópodos fitófagos, que eventualmente pueden ocasionar pérdidas productivas, económicas, y ambientales (Manco, 2006, Vecco, 2009). *Syphrea* sp (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticini), es fitófago masticador que se alimenta del follaje de *P. volubilis*, causando mayor a 30% de perforación presentándose como plaga potencial en este cultivo (Vecco, 2015).

En este contexto, los hongos entomopatógenos son excelentes candidatos para incorporarlos al plan de manejo de dicha plaga, cómo estrategia de menor impacto ambiental, específicamente *Beauveria bassiana* capaz de infectar a insectos de diferentes especies; reportándose aislamientos de más de 200 especies; y, actualmente es utilizado como insecticida biológico o biopesticida controlando gran número de insectos plagas (ICT, 2016). Trabajar con una cepa nativa adaptada a las condiciones agroclimáticas, permite que los conidios del hongo persistan más tiempo en el ambiente y tengan mayor oportunidad de parasitar al insecto (Barajas, Morales, Del pozo, Rodríguez y Núñez 2009).

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la virulencia de una cepa nativa de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Syphrea* sp colectados en campos de Sacha Inchi en sectores de Pinto Recodo - Provincia de Lamas, a través del porcentaje de mortalidad, el tiempo de mortalidad y el tiempo de aparición del micelio sobre *Syphrea* sp .

Comprende tres capítulos, en el primer acápite se orientó a brindar el marco teórico conceptual del tema en estudio. Luego se abordó sobre los materiales y la metodología utilizada en la investigación y, por último, el tercer capítulo describe los resultados y discusiones obtenidos en la evaluación de la capacidad patogénica de la cepa nativa de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Syphrea* sp .

# CAPÍTULO I

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

#### 1.1.1. Antecedentes

El Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) descrita en 1753, es una Euphorbiaceae que comúnmente se conoce como maní del monte, sachá maní o maní del inca. Se encuentra distribuida en el trópico latinoamericano desde el sur de México, la Amazonía y el Acre de Bolivia. En el Perú se ha recolectado en Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa, San Martín, Rodríguez de Mendoza, Ucayali (Pucallpa, Contamana y Requena), Putumayo, Loreto, Junín, Cusco y Caballococha), registrándose especies como: *Plukenetia volubilis* L., *P. lorentensis* Ulei, *P. brachybotrya* M., *P. polyadenia* M. (Gallusser, 2005).

#### 1.1.2. Descripción botánica

Es una planta monoica, con flores hermafrodita y estaminada; las primeras son pequeñas, blanquecinas, y dispuestas en racimos, las otras se encuentran en la base del racimo y ubicadas lateralmente de una a dos flores, debido a su naturaleza florística es preferentemente de polinización cruzada. Presenta una asincronía entre la liberación del polen y la receptividad del estigma (Dicogamia, de la clase Protoginia); lo que evita que la progenie reúna las mismas características de la planta madre (Cachique, 2006).

Es una enredadera que necesita luz, requiere de tutores y de tendales de alambres, es una liana, inestable, semi-leñosa, de altura indeterminada, aunque las plantas deben tener una altura no mayor de 2 m para facilitar la cosecha. La floración se inicia a los 3 meses del trasplante, apareciendo primero los primordios florales masculinos y luego los femeninos. En un período de 7 a 19 días, las flores masculinas y femeninas completan su diferenciación floral. La formación y desarrollo de frutos se completa 4 meses después de la floración. La maduración propiamente dicha se inicia cuando

los frutos de color verde se tornan de color negruzco, los que finalmente se convierten en marrón oscuro o negro cenizo, indicador que está listo para la cosecha. Este proceso de maduración del fruto dura de 15 a 20 días, iniciándose la cosecha a los 7,5 meses después de la siembra y/o trasplante. Tiene una producción de cinco años de vida útil, extensible hasta los 10 años. El fruto es una cápsula de 3,5 a 4,5 cm de diámetro, con cuatro lóbulos aristados o tetra lobados, dentro de los cuales se encuentran cuatro semillas. Excepcionalmente, algunos ecotipos presentan cápsulas con 5 a 7 lóbulos, la semilla tiene forma ovalada, de color marrón oscuro, ligeramente abultadas en el centro y aplastadas hacia el borde, Según los ecotipos, el diámetro fluctúa entre 1,3 y 2,1 cm (INIEA, 2005, Manco, 2006, Flores, 2009).

## **1.2. *Syphrea* sp (Chrysomelidae: Alticini)**

A pesar de ser considerado el sachá inchi como un recurso vegetal prometedor de la región y el Perú, se han visto limitaciones para cultivar debido a la falta de programas de investigación en mejoramiento genético, manejo agronómico, resistencia a plagas y enfermedades; de manera que se puedan obtener variedades competitivas en la industria de aceites en el mercado nacional e internacional (Tito y Bautista, 2009). La presencia de *Syphrea* sp (Chrysomelidae: Alticini) fitófago masticador, poco estudiado y con presencia informada en la región Ucayali (IIAP, 2008) y en San Martín fue reportada a medianos del año 2006 (Vecco, Pinedo, Fernández y Cabe 2009) en tres zonas ecológicas (Bajo Mayo, Huallaga y Caynarachi), mostrándose poblaciones altas causando >30% de perforación en la zona húmeda tropical de Pongo de Caynarachi (210 msnm). Sin embargo, tuvo menor presencia en campos en la zona seca tropical de Tarapoto (275-425 msnm) distante sólo a 60 km de Pongo de Caynarachi (Vecco *et al.*, 2009). En el año 2015, Vecco reafirma su estudio y menciona a *Syphrea* sp como plaga potencial para el cultivo de Sachá Inchi.

### **1.2.1. Características morfológicas de *Syphrea* sp**

*Syphrea* Baly, 1876 es un género grande con más de 100 especies en el Nuevo Mundo. La taxonomía del grupo está en mal estado; algunas especies probablemente se deben transferir a otros géneros (Vecco, 2015).

Los adultos de *Syphrea* se caracterizan por presentar cuerpo pequeño, ovoide, cilíndrico, raramente hemisférico, usualmente un poco hinchado, dorsalmente liso, en ocasiones con pubescencia. Cabeza prolongada dentro del pronoto hasta la región óptica posterior, a veces totalmente retraída. La frente en su mayoría con tubérculos y limitada en la parte de arriba por surcos angostos, surcos alrededor de los ojos, a menudo débiles o ausentes. El ápice de los tubérculos frontales no alcanza a unirse con la cavidad de las antenas. La parte más baja de la frente usualmente con una elevación en forma de quilla (quilla frontal), esporádicamente aplanada formando un triángulo visible. Mandíbulas flexibles con pequeños dientes y ojos hemisféricos. Antenas, usualmente 11 segmentos, en algunos casos de 10 a 9 segmentos y filiformes o gradualmente ensanchadas hacia el ápice. Pronoto transverso, más angosto que la base de los élitros y disminuyendo anteriormente. Élitros con lados paralelos, por lo general posteriormente anchos, raramente hemisféricos. Protórax con procesos visibles entre las coxas. Abdomen sin estructuras especiales sobre los externitos, sólo el esternito anal a veces con una depresión visible en los machos. Alas con celdas anales simples a menudo ausentes. Patas con fémur ensanchado y en el interior con apodema para saltar. Tibia notablemente ensanchada hacia el ápice, en algunos géneros sub apicalmente con oquedades y pequeños dientes, con o sin espuela. Torso a menudo con el primer segmento muy alargado; las uñas del segmento delgadas hacia el ápice o muy ensanchadas (Lopatin, 1984).

### **1.2.2. Bioecología de *Syphrea* sp**

Vecco (2015), hace importantes aportes sobre la localización y movilidad diurna de los adultos de *Syphrea* sp en la planta de *P. volubilis*. Los adultos de *Syphrea* sp tienen preferencia alimenticia sobre hojas jóvenes e inmaduras, y quizás polen. Estos recursos se encuentran en mayor abundancia en la parte externa de la planta, particularmente en el tercio superior. El mayor valor de la amplitud del nicho ecológico para la mañana (8:00-9:00) indica que los insectos estuvieron más dispersos o más uniformemente distribuidos dentro de la planta. Después de esta hora, los adultos de *Syphrea* sp tienden a

refugiarse en el envés de las hojas, en la parte interna de la planta, o hojarasca, hojas en contacto con el suelo u hospedantes alternos, como una respuesta al incremento de la temperatura ambiental, la cual se aproxima al máximo durante el inicio de la tarde (13:00-14:00), con  $1,1 \pm 0,4$  y  $0,8 \pm 0,3$  individuos por planta, la mayor población fue al atardecer (17:00-18:00), con  $1,6 \pm 0,4$  individuos por planta. Esto podría explicar la respuesta sistemática del descenso poblacional, el incremento percibido de la población de *Syphrea* sp en las partes internas, y la reducción de la amplitud del nicho ecológico en el horario de 13:00-14:00. Se puede considerar la tendencia del comportamiento diurno de los adultos de *Syphrea* sp para inferir los aspectos relacionados a su comportamiento nocturno. A pesar de que las hojas jóvenes e inmaduras de *P. volubilis* constituyen recursos tróficos indiscutibles, una importante proporción de individuos se mantienen fuera de este recurso al atardecer, lo cual puede asociarse a la escasez de hojas jóvenes e inmaduras causada por la estación seca sobre la fenología del cultivo.

En general muchas especies de plantas tanto anuales como perennes tienen la capacidad de soportar cierto grado de defoliación sin reducir su producción. Una defoliación temprana un tanto severa pero que no cause la muerte de la planta puede provocar retraso en su desarrollo; el mismo grado de defoliación durante la floración, formación de botones, o fructificación puede afectar la producción provocando la caída de estos órganos. Una defoliación tardía puede no tener efecto alguno sobre la producción de frutos o tubérculos de una planta. Si lo que interesa comercialmente es el follaje y no los frutos, como sucede con muchas hortalizas de hoja, el daño al follaje tendrá importancia económica cualquiera que sea el momento en que ella se produzca (Anteparra *et al.*, 2014).

### **1.3. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.**

El control microbiano es una rama del control biológico y se refiere al uso de microorganismos como agentes de control, tales como bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos entomopatógenos (Nussenbaum, 2014).

Los hongos entomopatógenos son importantes componentes del control de varios insectos plaga de agricultura y vectores de enfermedades. Estos hongos pueden encontrarse en distintas ubicaciones geográficas y climáticas, tanto en suelos cultivados como naturales (Vega *et al.*, 2009). Ellos tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de artrópodos y producir la muerte del hospedador (Humber y Soper, 1986). Además, todos los hongos entomopatógenos poseen un ciclo de vida sincronizado con los estados del hospedador y las condiciones ambientales (Shah y Pell, 2003).

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* ó *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*, sin embargo, la más frecuentemente estudiada es *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *B. bassiana* es un hongo que pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae, este hongo ha sido encontrando atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de importancia agrícola. Pertenece al género de hongos anamórficos cosmopolitas, habitantes del suelo, necrótrofos, patógenos facultativos de artrópodos (Goettel, Eilenberg y Glare, 2005) que se los puede encontrar también como saprófitos y endófitos en plantas (Vega *et al.*, 2009).

### 1.3.1. Descripción morfológica

Morfológicamente, *Beauveria bassiana* está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis (Barron 2001, Carillo, 2005, Kouassi 2001).

Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas (Kouassi 2001). Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blanquizca para el ojo humano (Barron, 2001). Los

conidióforos son abundantes desarrollándose de hifas vegetativa; las conidias son hialinas, aplanadas, globosas y ampliamente elipsoidales. *B. bassiana* es un hongo de apariencia polvosa, de color blanco algodonoso o amarillento cremoso, y a medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillenta y cremosa. Este hongo presenta una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo de los artrópodos muertos, tanto como sobre medios de cultivo, la cual está formada por el micelio y conidios. Los insectos atacados por este hongo presentan una sintomatología característica, el cuerpo permanece con su forma normal, pero lleno su interior de un micelio muy apretado. Las estructuras reproductoras del hongo emergen generalmente a través del tegumento y le dan el aspecto que nos facilita su clasificación (Rehner *et al.*, 2011).

### **1.3.2. Mecanismos de acción de *B. bassiana***

En general la mayoría de los hongos de plantas y vertebrados infectan al hospedante a través de la cutícula. El contacto entre la unidad infectiva del entomopatógeno y el insecto es indispensable para el inicio del proceso micótico (Senasa, 2014).

Las etapas en el desarrollo de la micosis (Monzón 2001, Giraldo, 2009, Cañedo, 2004, Senasa, 2014) son:

1. Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto. Es el contacto de la unidad infectiva del hongo o conidia con la superficie del insecto. Las características físicas y químicas de las superficies de la cutícula del insecto y la espora son las responsables de esta unión, algunas glicoproteínas pueden servir como un receptor específico para las esporas. Las zonas de adhesión, son las regiones intersegmentales o zonas blandas.

2. Germinación de la conidia. Es el proceso mediante el cual, la conidia o espora sobre el integumento del insecto, germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio con el cual se fija en la cutícula, y con el tubo germinativo o haustorio (hifa) se da la penetración al cuerpo del

insecto. El tubo germinativo puede ser largo o corto y en algunos casos no llega a formarse. El tiempo de germinación dependiendo de la cepa es de 12 a 20 horas. Para una germinación adecuada se requiere una humedad relativa del 90 % y temperatura de entre 23 a 28 °C, soportando temperatura máxima de 35 °C (Bastidas, 1998).

3. Penetración del integumento. La penetración de la cutícula del insecto, ocurre como resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. En este proceso participa un mecanismo físico (acción de presión sobre la superficie de contacto) y otro químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe la áreas esclerotizadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasa y quitinasas, las cuales degradan el tejido de la zona de penetración, lo que facilita la penetración física. El tiempo de penetración es de 8 a 12 horas.

4. Multiplicación del hongo en el hemocele. Una vez que el hongo llega al hemocele, la hifa se ensancha y ramifica en la cavidad general del cuerpo del insecto, en forma de levaduras o desarrollo por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamados blastosporas, sin embargo, no ocurre gran crecimiento hifal antes de la muerte del insecto (Giraldo, 2009).

5. Producción de toxinas. Los hongos producen toxinas que matan al insecto, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas y matan al insecto al consumir todos sus nutrientes. Las toxinas son sustancias de baja toxicidad para mamíferos pero muy tóxicos para artrópodos, causando la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas, produciendo la degeneración de los tejidos producto de la pérdida de integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido, además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del insecto. Las toxinas producidas pueden ser enzimas, las cuales son secretadas en cantidades significativas tanto en el cuerpo del insecto como en medios de

cultivo (lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas), o metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pudiendo ser afectada por diferentes factores como nutrientes, pH, temperatura, etc.

6. Muerte del insecto. La muerte del insecto infectado, ocurre generalmente antes de que el hongo colonice totalmente el hemocele del insecto, debido en gran parte a la acción de las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la fase saprofitica. El tiempo de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales.

7. Colonización. Una vez muerto el insecto, el micelio invade todos los órganos y tejidos. Después de la colonización, en la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales que impiden la descomposición del insecto manteniéndolo como una momia, también puede presentarse el cambio de color en el cadáver del insecto. El tiempo que dura la colonización es de 3 a 8 días, dependiendo de la cepa del hongo.

8. Emergencia. Después de muerto el insecto, si las condiciones de humedad relativa ambiental son favorables, (mayor o igual al 90%) el hongo emerge al exterior a través de la cutícula principalmente a través de las zonas menos esclerosadas, y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones externas no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto, protegido por el integumento, donde puede sobrevivir por algunos meses, hasta que lleguen las condiciones favorables para su esporulación.

9. Esporulación. Cuando las hifas emergen al exterior y si las condiciones de humedad relativa son favorables, ocurre la producción de conidios o esporas en un período de 24 a 48 horas. En esta fase el insecto muerto adquiere la coloración característica del hongo involucrado.

10. Diseminación. Las conídias o esporas del hongo que son las unidades infectivas se diseminan por medio del viento, lluvia, animales, hombre,

buscando nuevos hospedantes para iniciar el proceso de infección. La dispersión puede ser un proceso activo o pasivo, dependiendo de las características de la conidia y del esporangio.

### 1.3.3. Modo de infección

Según Alves, 1998, Jaramillo, 2012, mencionan que cuando los conidios y toxinas entran en contacto con el insecto, la acción patogénica puede ocurrir de dos maneras:

1. Durante el proceso fermentativo de producción de *B. bassiana* se producen una gran variedad de toxinas y ácidos metabólicos. Los compuestos tóxicos más estudiados son el Beauvericin, el Bassianolide y las Enniatinas A y B, Estos son dos ciclodepsipéptidos conformados por el ácido hidroxisovalérico y los aminoácidos N-metil-fenilalanina, N-metil-leucina, N-metil-isoleucina y N-metil-valina respectivamente. Cuando el insecto ingiere las toxinas al ser aplicado el producto estas causan una parálisis muscular y un efecto de "Knockdown" sobre los insectos susceptibles, produciéndole disturbios a nivel digestivo, nervioso, muscular, respiratorio, excretorio, etc; es decir el insecto se enferma, deja de alimentarse y posteriormente muere. La muerte puede ocurrir a los tres a cinco días, dependiendo de la virulencia del hongo y estadio del insecto. Las larvas y adultos que sobreviven los primeros días, no causan más daño al cultivo (Alves, 1998). Algunas de estas larvas logran empuparse, pero son pequeñas y los adultos que emergen son estériles. Otros ácidos metabólicos, como el cítrico y oxálico solubilizan proteínas cuticulares, colaborando en la infección del hongo. Un fenómeno que ocurre en insectos en estado adulto afectados por el hongo es la migración y se observa una súbita desaparición de plaga sin observar individuos muertos. Sobre la función de estos metabolitos también se apunta que son antibióticos que pueden prevenir las pudriciones por bacterias y permitir la momificación de cadáveres de insectos (Suárez, 2009).

2. La infección puede producirse por vía oral, a través de los espiráculos y de forma particular a través de la superficie del tegumento; esto nos lleva a pensar que existe la posibilidad teórica de infectar insectos

independientemente de su actividad alimentaria. Las esporas germinan en el estómago en las primeras 72 horas, luego las hifas pueden penetrar las paredes del integumento, permitiendo que los jugos gástricos penetren el hemocele. Esto a su vez causa una variación en el pH de la hemolinfa. La muerte del insecto es ocasionada por la acción de toxinas, producidas durante el crecimiento micelial. El modo de penetración depende de las propiedades de la cutícula, su espesor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. La fase de patogénesis ocurre cuando los conidios entran en contacto con el tejido vivo del hospedante. El hongo penetra a través de la cutícula por acción mecánica y efectos enzimáticos (Bastidas *et al.*, 2009).

Enzimas como la quitinasa, la proteasa y la lipasa, actúan de manera sinérgica para digerir y penetrar la epicutícula. La invasión del hemocele y de tejidos se produce, a través de cuerpos hifales entre las 24 y 48 horas siguientes. Las enzimas detectadas en tubos germinativos son proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y N acetyl glucosamida (quitinasa). Estudios de patogenicidad de *B. bassiana* han revelado que la composición de los hidrocarburos en la epicutícula, afecta la germinación de los conidios, la adherencia y penetración del hongo. Se ha observado que, en la superficie de insectos, existen nutrientes que utiliza el hongo para su germinación y desarrollo, *B. bassiana* ha mostrado tener efectos subletales sobre insectos que de alguna forma contribuyen al control de éstos (Cortes, 2010).

#### **1.3.4. Influencia de los factores ambientales sobre *B. bassiana***

Los factores del clima, particularmente la humedad y la temperatura, así como también la luz y el viento, los rayos ultravioletas, son considerados como muy importante en los procesos de infección y esporulación de hongos entomopatógenos y por tanto en la epizootiología. La susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrientes presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos. Las esporas de los entomopatógenos tienen requerimientos específicos de agua y temperatura, así como de otros factores ambientales que

en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno y que les permiten llevar a cabo el proceso infeccioso sobre el hospedero (Goettel *et al.*, 2005).

*B. bassiana* requiere valores de humedad relativa no menos de 90% durante 10 horas para producir epizootias. Un rango entre 5- 30°C con un óptimo de 20 a 30°C favorece a *B. bassiana*, conidios de *B. bassiana* almacenados entre 4 y 8°C permanecen viables por 1 a 3 años, en tanto si se almacenan a 21°C disminuyen su viabilidad a los pocos meses (Godoy, 2007).

### 1.3.5. Rango de hospederos de *B. bassiana*

Se han encontrado cepas de *B. bassiana* con virulencia hacia importantes plagas para la agricultura. Se ha utilizado para el combate de la cucaracha de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), termitas y hormigas (*Acromyrmex* sp, *Atta* sp), broca del maíz (*Ostrinia nubilalis*), oruga del pino (*Dendrolimus* spp), grillos verdes (*Nephotettix* spp) y la polilla (*Laspeyresia pomonella*) (Wong, 2003). También *Anthonomus grandis* del algodón, *Cosmopolites sordidus* del banano, *Ancognatha* sp y *Phyllophaga* sp de la papa, *Compsus* sp en ornamentales, *Cosmopolites sordidus* y *Pseudococcus* sp en piña, *Loxotoma elegans* en palma, *Trips* sp, ácaros en general y *Corytucha* sp en hortalizas y frutales, entre otras (Edafon, 2005).

Los resultados de analizar la mortalidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio se vio que hubo una variabilidad en la mortalidad del 6% hasta el 96,7% en *Cosmopolites sordidus*. Mientras que los valores más bajos de TL<sub>50</sub> fueron de un mínimo de 6,21 días hasta los 13,7 días (Biaggioni *et al.*, 2011).

Un ensayo de esporulación de *Cosmopolites sordidus*, plaga en plátano, realizado con 2 cepas de *Beauveria bassiana*, bajo condiciones de laboratorio y en cámaras de humedad, que causaron mortalidad sobre *Cosmopolites sordidus* dieron porcentajes de esporulación diferentes. Una cepa nativa

alcanzo un 93,7% de esporulación y una cepa Comercial de *Beauveria Bassiana* alcanzó un 50,2% de esporulación (Ríos, 2007).

Al evaluar la efectividad de dos cepas del hongo *Beauveria bassiana* para el control del gorgojo del banano *Cosmopolites sordidus*, plaga en plátano bajo condiciones de laboratorio con adultos traídos de campo capturados a través de trampas, la cepa de (*Beauveria bassiana* 26), con una concentración  $1,76 \times 10^9$  conidias/ml + Adherente conidias/g causó la más alta mortalidad con 82,72% y fue la que más rápido alcanzó el Tiempo Letal medio con 9,74 días (Gil, 2017).

Al evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) plaga de maíz almacenado, en condiciones de laboratorio con gorgojos criados en el laboratorio, con cuatro concentraciones ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$ ) de *B. bassiana* provocaron mortalidad promedio de 98,37%,obtuviendose a una concentración  $1 \times 10^6$  un  $TL_{50}$  a los seis días con una mortalidad del 60%; la  $1 \times 10^7$  lo logró a los siete días con una mortalidad del 59,16 %, la  $1 \times 10^8$  lo alcanzó a los ocho días con una mortalidad del 74,16% y la  $1 \times 10^9$  tuvo su  $TL_{50}$  a los diez días con 77,50 de mortalidad (Suárez,2009).

Un ensayo de con cuatro cepas nativas de *Beauveria bassiana* (ABvPr11, ABvPr8, ABvPr3 y ABvSr4), para evaluar la capacidad entomocida en la langosta *Schistocerca piceifrons* peruviana, muestran que todas las cepas, en soluciones de  $10^8$  conidias/ml, producen un 100% de mortalidad. El tiempo que se necesitó para eliminar el 100% de las langostas, para las cepas ABvPr11, ABvPr8, ABvSr4 y ABvPr3 fue de 12, 14 y 16 días respectivamente. El  $TL_{50}$  de la población de langostas, con un intervalo de 8,38 a 9,16 días y el  $TL_{80}$  fue de 9,6 a 11,5 días. La cepa ABvPr11 presentó la mayor actividad entomocida para el control de *Schistocerca piceifrons peruviana* L.A. (Pariona, Castellanos y León, 2007).

Las pruebas de virulencia en laboratorio de *Beauveria bassiana* en Mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024, Bb9119) mostraron mortalidades sobre brocas

recién emergidas del 94% a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml para todos los tratamientos, causando la muerte de los insectos en un periodo estimado entre los 4,54 y los 6,36 días (Jaramillo, 2012).

Al evaluar la actividad de dos cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bb26 y BbJLSV) sobre adultos de *Anastrepha obliqua*, en condiciones de laboratorio, la cepa Bb26, con una concentración de  $1,52 \times 10^8$  conidios/ml, fue la que ocasionó mayor infección (99,8%) provocando mortalidad con el menor tiempo letal medio ( $TL_{50} = 5,3$  días) seguida por la cepa BbJLSV con una concentración de  $1,76 \times 10^8$  conidios/ml se obtuvo (93,5%) de infección, provocando mortalidad con el menor tiempo letal medio ( $TL_{50} = 6,4$  días) (Hernández, Pérez y Toledo, 2010).

Al evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre larvas y adultos de *Euxesta stigmatias*, mosca de los estigmas del maíz, obtenidos de cría del laboratorio, a una concentración de  $1 \times 10^9$  blastosporas/ml por inmersión y aspersión. Los resultados indicaron patogenicidad contra larvas en rangos de 97 a 100%, se encontró además que *B. bassiana* fue capaz de infectar al 97% de adultos de la mosca (Archuleta, García, Vázquez y López, 2010).

En busca de cepas de mejor virulencia los investigadores de Cenicafé han estudiado 11 cepas nativas obtenidos de broca y otros insectos con el objetivo de determinar cuál de ella presenta mejores resultados siendo la cepa Bb 9205 la que presentó 89,1 % de mortalidad en adultos de broca del café a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml con brocas de cría de laboratorio (Góngora, Marín y Benavides, 2009).

#### **1.3.5.1. Experiencias regionales de trabajos con *Beauveria bassiana***

Pilco (2001) menciona que para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre broca de Café (*Hypotenemus hampei*) se aisló cepas de diferentes puntos de la Región San Martín y se llevaron al laboratorio de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) para su aislamiento.

El aislamiento de *Beauveria bassiana* se hizo mediante la recolección de frutos con presencia de brocas momificadas y con micelio blanco, ubicadas en orificio de entrada, partiéndose con cuidado para extraer la broca infectada.

Las brocas infectadas fueron desinfectadas externamente con legía al 0,5% por 10 min, se enjuagaron tres veces con ADE. Una vez secas se colocaron en cámaras húmedas hasta la esporulación del hongo.

Las brocas con esporulación fueron procesados para aislar el hongo, sembrando en medio PDA.

Se trabajo con brocas cría de laboratorio desinfectados y sumergidos en una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml, el periodo de evaluación fue de 10 días, teniendo como parámetros evaluados, número de brocas muertas, número de brocas vivas, número de brocas esporuladas, número de brocas no esporuladas y porcentaje de mortalidad.

#### **1.4. Producción de hongos entomopatógenos**

El mayor impacto al usar hongos como agentes de control probablemente será obtenido en aquellos casos en que el patógeno pueda ser manipulado en la misma forma que un insecticida químico. Muchos hongos entomopatógenos pueden ser cultivados en medios artificiales y son, por tanto, candidatos potenciales a ser desarrollados como micoinsecticidas. El proceso de producción se basa en la selección de la cepa, la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas) en un sustrato natural (CATIE, 2010).

La variabilidad intraespecífica en los hongos entomopatógenos en cuanto a rango de hospederos, características fisiológicas y virulencia, hace necesario la caracterización para seleccionar aislamientos con las mejores características como agentes de control (Gerónimo *et al.*, 2016). Es importante evaluar el mayor número de cepas, mediante bioensayos estandarizados, para detectar estas diferencias. Otros parámetros, como velocidad de crecimiento, intensidad de la esporulación, rapidez para invadir el hemocele del insecto, deben ser considerados

(Bhattacharryya, Baruah, Purnima, y Bhuyan, 2008). La producción de hongos para el control de plagas implica una amplia investigación donde se involucran disciplinas como la patología, ecología, genética y fisiología, además de técnicas para la producción masiva, formulación y estrategias de aplicación (Cortez, 2010).

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Método de Investigación

##### 2.1.1. Ubicación del experimento

El trabajo se ejecutó en el Laboratorio de Fitopatología del IIAP-San Martín y en el vivero del mismo, situado en el Jr. Belén Torres de Tello N° 135 del distrito de Morales.

Ubicación geográfica del proyecto: Zona 18 WGS 84: 9283666N -347743E – IIAP-SM



Fig. 1. Ambientes del laboratorio de Fitopatología del IIAP-SM.

#### Fase de laboratorio

Se trabajó con una cepa nativa que pertenece a la Micoteca del Laboratorio de Fitopatología del IIAP-SM, la misma que fue colectada por el Ing. Jaime Cayotopa Torres, obtenida a partir del aislamiento de un crisomélido fitófago de una parcela de Sacha Inchi del Distrito de Pinto Recodo- Lamas ubicada a 339 m.s.n.m.m en el año 2017.

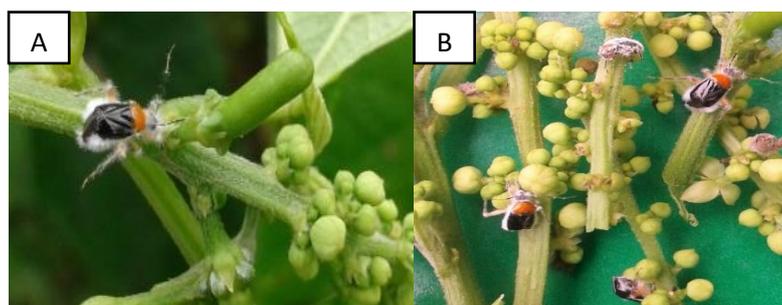


Fig. 2. Textura y nivel de esporulación de *Syphrea* sp. A. *Syphrea* sp con esporulación reducida. B. *Syphrea* sp con esporulación de textura: algodonosa y reducida (Fotografías tomadas el mismo día).

✓ **Reactivación de inóculo de *B. bassiana* en medios de cultivo**

Para la reactivación de la cepa almacenada de *B. bassiana*, se realizó en adultos de *Syphrea* sp tomados de las jaulas de aclimatación, antes de iniciar la evaluación de la patogenicidad en adultos.

Para esto se utilizaron insectos vivos procedentes de jaulas de aclimatación en vivero, que no muestren síntomas de afectación por algún patógeno.

Se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5%, durante 2 minutos, y se enjuagaron por tres ocasiones con ADE; luego se colocaron sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de humedad y posteriormente se inocularon con el hongo. Finalmente se sumergieron los insectos en una solución madre. Los insectos inoculados fueron colocados en jaulas de madera forrados con tela organza, proporcionándoles humedad y alimento hasta que se produzca la muerte del mismo. Los insectos muertos fueron acondicionados en cámara húmeda (placas petri), se colocó ADE y cuatro portaobjetos en cruz, para promover el crecimiento del micelio y confirmar la muerte por infección del hongo. Se selló la placa con parafilm y se dejó incubar para su posterior observación en el estereomicroscopio (CATIE, 2014).

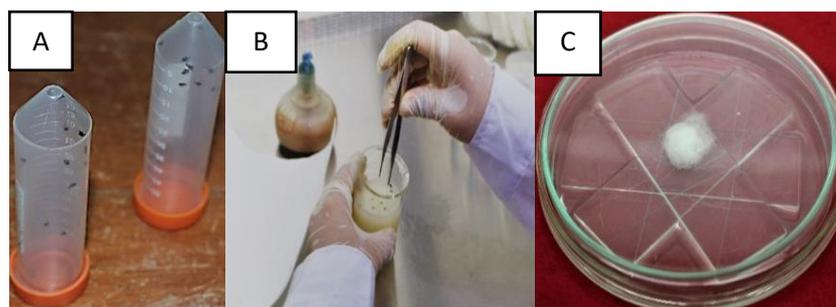


Fig. 3. Reactivación del inóculo en *Syphrea* sp. A. Insectos capturados de la jaula de aclimatación. B. Insectos sumergidos en la solución madre. C. Insecto momificado presentando esporulación por *Beauveria bassiana*.

Se incubó a temperatura entre 25 a 27°C durante 7 días. Con una aguja de siembra, en la cámara de flujo laminar, se tocó levemente el cuerpo del insecto donde se observó crecimiento fungoso y se transfirió su contenido a medio de cultivo PSA, que previamente fue preparado y guardado en refrigeración en frascos con tapa rosca de 250 ml y 500 ml (CATIE,2014).

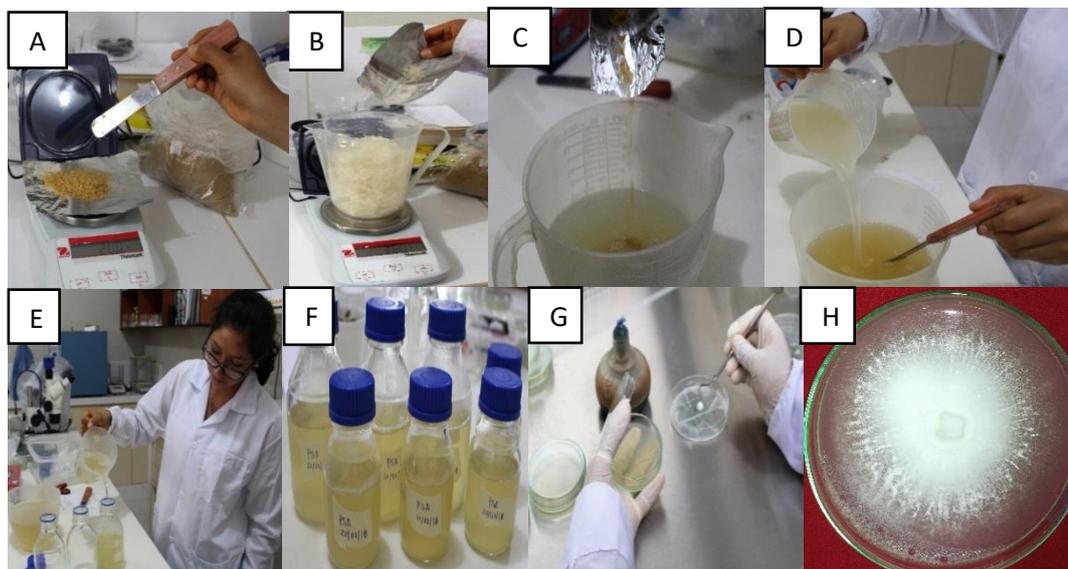


Fig. 4. Preparación de medio de cultivo PSA. A. Pesado de 20 g de sacarosa para 2 litros de medio de cultivo. B. Pesado de 36 g de Agar Agar para 2 litros de medio de cultivo. C. Añadiendo sacarosa al caldo papa. D. Añadiendo Agar disuelto al caldo papa + sacarosa. E. Vertiendo medio de cultivo PSA en frascos con tapa rosca. F. Frascos con tapa rosca con medio de cultivo PSA. G. Siembra del micelio del hongo esporulado en medio PSA. H. *Beauveria*

#### ✓ Producción de *B. bassiana* en sustrato de arroz

El método de producción que utiliza el Laboratorio del IIAP-San Martín es la semi-industrial, siguiendo las metodologías que se detalla a continuación, propuesta por (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 y ICT, 2016).

#### ✓ Preparación del medio líquido

Los medios líquidos utilizados para la producción masiva, varían de acuerdo a la especie de hongo entomopatógeno que se va a producir, para *B. bassiana* el medio líquido que se utilizó fue caldo papa dextrosa (250 g de papa, dextrosa 18 g, agua destilada 1 l). Este medio se preparó en frascos con tapa rosca en frascos de 1000 ml, y se esterilizó a 121 °C y 15 lb (1 atm) de presión por 25 minutos (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 e ICT, 2016).



*Fig. 5.* Preparación del medio líquido. A. Pesado de 500 g de papa. B. Pesado de la Sacarosa. C. Colocación de Frascos con tapa rosca conteniendo el medio Líquido a la autoclave. D. Esterilización de Frascos con tapa rosca conteniendo el medio Líquido a 121 °C y 15 lb.

#### ✓ **Preparación del sustrato de arroz**

El sustrato fue pesado en bolsas de polipropileno de 10 x 15 pulgadas, se colocaron en doble bolsa, agregándole agua a razón de 250 ml/800 g, se realizó la mezcla hasta que todo el sustrato quedó húmedo, luego se engraparon las bolsas en el borde superior y se esterilizó en la autoclave a 121 °C, 15 libras de presión por 45 minutos (Fernández, 2004; CATIE, 2010, Senasa,2014 e ICT, 2016).

#### ✓ **Producción de inoculante en medio líquido**

Una vez fríos los medios líquidos, se llevaron a la cámara de flujo laminar y se le agregó aproximadamente 0,1 g de cloranfenicol a granel. Se seleccionó la mejor placa previamente analizada, es decir libre de contaminación, buena esporulación, desarrollado en medio de cultivo PSA de siete días de edad. Se obtuvieron discos de medio colonizado con el hongo para ser inoculados en matraces conteniendo medio de cultivo líquido. Terminada la siembra se cerraron con su respectiva tapa estéril de papel aluminio, se cubrió finalmente con parafilm y se llevaron a un agitador orbital a 160 rpm durante tres a cuatro días a la temperatura de 24 a 28 °C (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 e ICT, 2016).

#### ✓ **Inoculación del sustrato con el medio líquido**

Una vez frías, las bolsas con el arroz se llevaron a la cámara de flujo laminar, se desinfectó el borde de cada bolsa con un algodón embebido en alcohol, se abrió cuidadosamente las bolsas y se inoculó con 20 ml del caldo líquido agitado. Se cerraron nuevamente la bolsa y se agitó para homogenizar el inóculo con el sustrato (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 e ICT, 2016).

### ✓ **Incubación del sustrato**

Las bolsas inoculadas se llevaron a la sala de germinación a temperatura de 24 a 28 °C, incubándose en oscuridad los primeros 3 días para favorecer el desarrollo del micelio. Al finalizar el tercer día se encendió la luz de los cuartos de incubación. Al cuarto día de incubación, las bolsas fueron quebradas suavemente para favorecer la oxigenación de todo el sustrato y fueron dejadas 7 a 21 días hasta completar la esporulación. En esta etapa se revisaron las bolsas diariamente, eliminando las que se presentaron poco homogéneas, así como las bolsas con presencia de contaminantes (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 e ICT, 2016).

### ✓ **Secado del producto final**

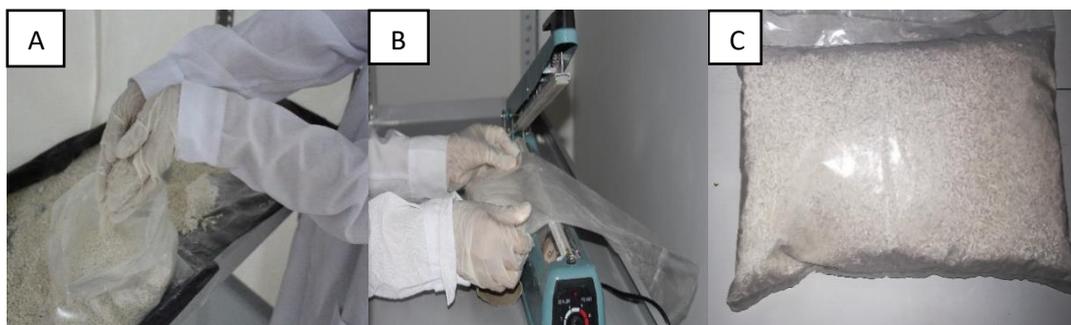
Con la finalidad de secar el producto, se abrieron las bolsas por el centro, con lo que se consiguió bajar la humedad a 30 - 35%. Para disminuir la humedad hasta 15%, se vació el sustrato a plásticos de polietileno desinfectados con alcohol, encendiendo el aire acondicionado (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 e ICT, 2016).



*Fig. 6.* Secado del producto final. Bolsa con sustrato de arroz esporulado. B. Vertiendo el arroz esporulado a plásticos para disminuir la humedad. C. Dispersando el arroz esporulado en el plástico para su mejor secado. D. Remoción periódica del sustrato de arroz para mejorar el secado.

### ✓ **Cosecha del hongo entomopatógeno seco**

El producto final fue cosechado en bolsas, pesado a 800 g y sellado. El rendimiento de esporas por kilo estuvo en función a la especie producida. Para la cosecha se utilizó vestuario de bioseguridad (mascarilla, mameluco cuerpo completo lavable) (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 y ICT, 2016).



*Fig. 7.* Cosecha del hongo entomopatógeno. A. Sustrato de arroz en bolsa de polipropileno de 10 x 15 pulg. B. Sellado de la bolsa de polipropileno con 800 g de sustrato de arroz. C. Producto obtenido.

#### ✓ **Conservación del hongo entomopatógeno o producto final**

En ambientes provistos de temperatura de 5°C, el producto final se conservó inalterables sus características por más tiempo, y en temperaturas de 16 – 20 °C por 3 meses (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 y ICT, 2016).

#### ✓ **Control de calidad del producto final**

Se determinó la calidad del producto final obtenido, registrando el número de conídias por gramo de sustrato, viabilidad y pureza según las metodologías seguidas por Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 y ICT, 2016 a través de:

- Concentración de conídias: Determinado según las características de conidiación del hongo y en el método que se emplee para producirlo.
- Porcentaje de germinación o viabilidad: mayor o igual al 90%
- Pureza: 100%

#### • **Recuento directo de conídias**

Se pesó 1 g, de arroz esporulado, y se agregó 10 ml de Tween 0,1%, en este caso la suspensión de conídias corresponde a  $10^0$ , se mezcló homogéneamente. Luego se realizó la dilución  $10^1$  tomando 1 ml de tubo de ensayo a un tubo de ensayo con 9 ml de Tween 0,1%, se agitó durante 30 segundos en el vórtex; y así hasta llegar a la dilución  $10^2$ . Con una pipeta Pasteur, se tomó una muestra de la última dilución y se llenó la cámara de Neubauer. Se llevó al microscopio y se procedió a contar las conídias en el cuadrante central de la cámara. Se contaron cinco cámaras y se

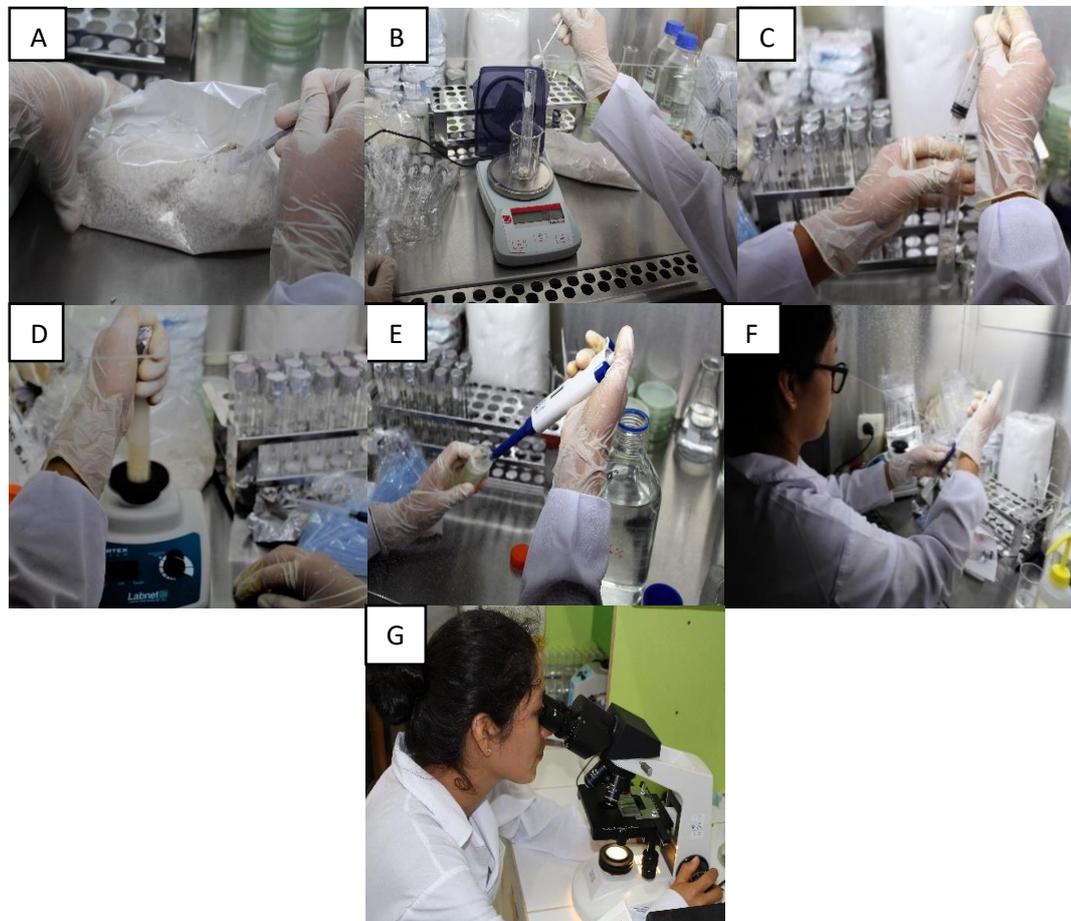
determinó la concentración de conídias por ml mediante la siguiente fórmula planteado por Senasa, 2014:

$$N^{\circ} \text{ conídias/ml} = X \cdot 5 \cdot 10^4 \cdot \text{ID}$$

5 = N° cuadraditos contados en el cuadrante central

X = Promedio de conídias contadas

ID = Inversa de la dilución empleada



*Fig. 8.* Recuento directo de conídias. A. Homogenización manual de la muestra de sustrato de arroz. B. Pesado 1 g de arroz esporulado. C. 9ml de ADE + Tween al 0,1% en cada tubo de ensayo. D. Mezcla homogénea en el vórtex el sustrato de arroz con ADE + Tween al 0,1%. E. Colocando 1 ml de la primera dilución a tubo de ensayo con ADE + Tween al 0,1%. F. Tomando 1 ml de la tercera dilución con la pipeta para llevarlo a la cámara de Neubauer. G. Conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

- **Porcentaje de germinación**

Con esta prueba se determinó el porcentaje de conídias típicas del hongo que está en condiciones de germinar en un tiempo determinado, después de haber sido sembrado en medio de cultivo para hongos. Se realizó diluciones seriadas de conídias del hongo en agua destilada estéril con tubos de ensayo siguiendo los siguientes pasos:

1. Se tomó 0,2 ml de la última dilución  $10^{-3}$  y se sembró en placas Petri conteniendo PSA, se incubó entre 15 a 20 horas.

2. En la cámara de flujo laminar, se cortó una porción de agar de  $1 \text{ cm}^2$  y se ubicó la muestra sobre un portaobjetos; y se colocó un cubre objeto. Las observaciones se realizaron en el microscopio utilizando el objetivo de 25x. Las variables que se midieron fueron: número de conídias germinadas, número de conídias sin germinar y el total de conídias. Como mínimo se observó un total de 200 conídias por cada montaje para que el dato obtenido tenga poco margen de error. Se hizo cinco recuentos por placa.

3. Se obtuvo el promedio de las lecturas realizadas y se calculó el porcentaje de conidios germinados, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} \cdot 100$$

a = número de conidios germinadas

b = número de conidios sin germinar

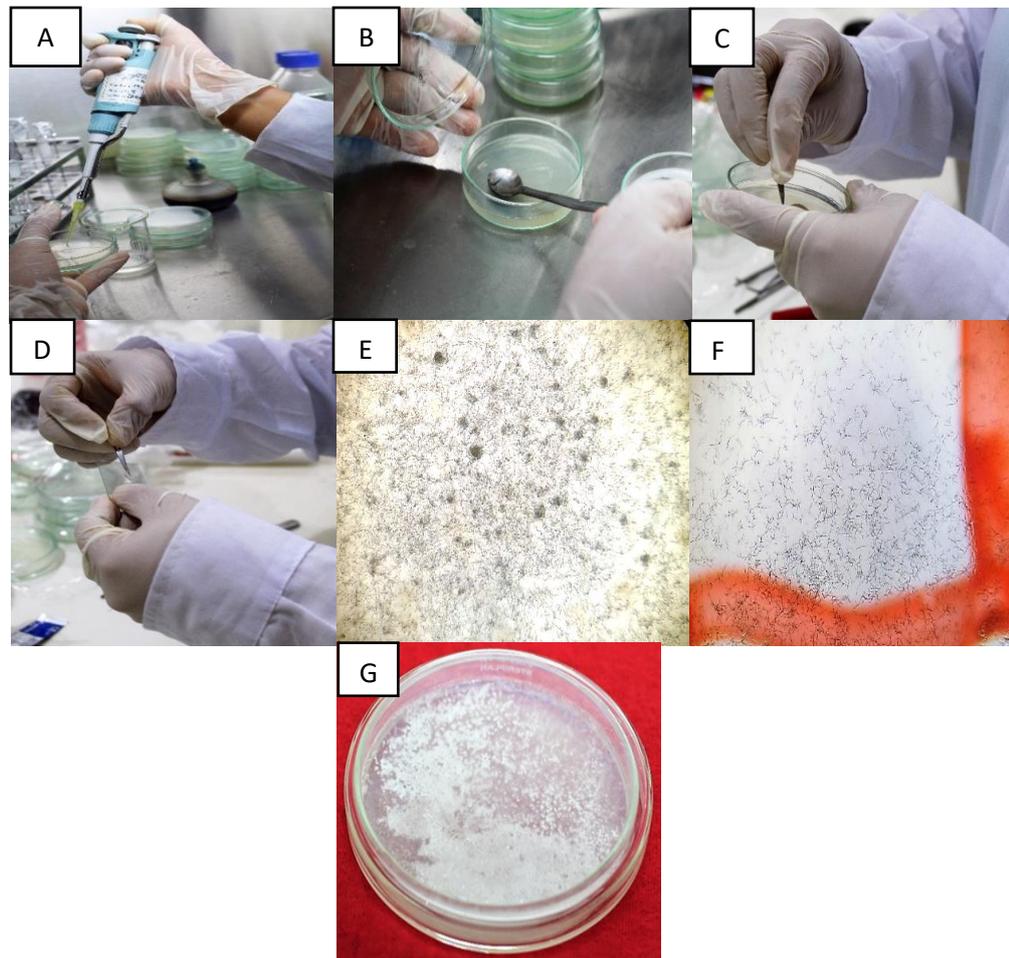


Fig. 9. Porcentaje de germinación. A. Tomando 0,2 ml de la última dilución  $10^{-3}$  a una placa con medio PSA. B. Esparciendo la solución vertida en placa con medio PSA. C. Corte de  $1 \text{ cm}^2$  del medio PSA. D. Colocando  $1 \text{ cm}^2$  del medio PSA en un porta objeto para hacer el recuento. E. Germinación de esporas a las 16 horas. F. Germinación de esporas a las 20 horas. J. Germinación en medio PSA.

- **Pureza**

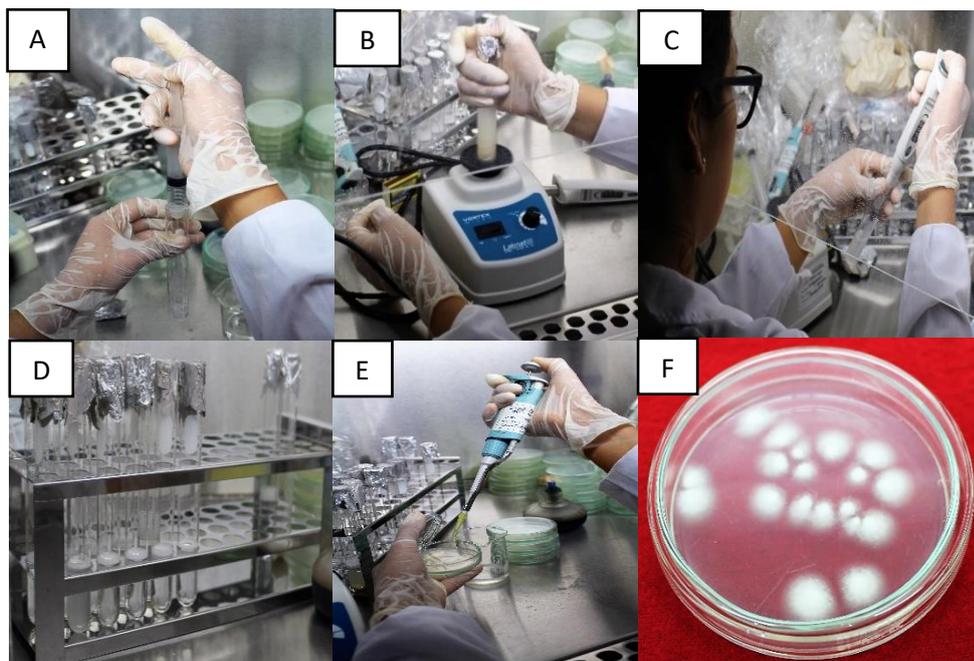
Se determinó si el producto final es puro o contiene contaminantes indeseables. Se procedió a realizar diluciones seriadas hasta  $10^{11}$ , se siembra 0,2 ml de la última dilución en placas conteniendo medio de cultivo PSA, se sembró tres placas, se incubó durante cinco días a temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{ C}$ . Se evaluó y se obtuvo el promedio del número de unidades formadoras de colonias UFC de los contaminantes y el número de UFC del hongo evaluado. Se multiplicó por la inversa de la dilución y el volumen empleado.

Finalmente, se aplicó los datos obtenidos a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{UFC h e}}{\text{UFC t}} \cdot 100$$

UFC he = Unidades Formadoras de Colonias del hongo evaluado

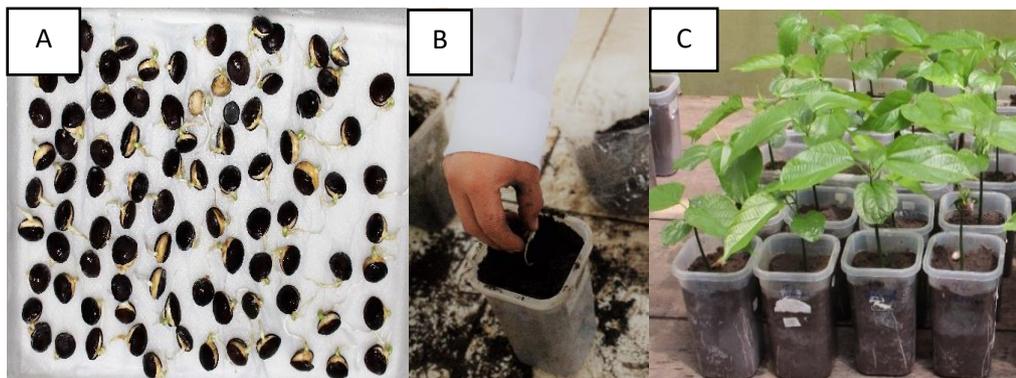
UFC t = Unidades Formadoras de Colonias totales



*Fig. 10.* Pureza. A. ADE + Tween 0,1% en tubos de ensayo para las diluciones. B. Homogenización de la muestra en el Vórtex. C. Colocando en el tubo de ensayo 1 ml de la solución homogenizada en el Vórtex. D. Tubos de ensayo hasta la dilución  $10^{11}$ . E. Colocando 0,2 ml de la última dilución en placas conteniendo medio de cultivo PSA. F. Placa de cultivo PSA con colonias blancas.

#### ✓ **Siembra de semillas de Sacha Inchi para alimentación de insectos**

Se utilizó suelo estéril, macetas de 1 kg y semillas pre germinadas de Sacha Inchi. Se colocó 1 semilla por cada maceta y se remojó diariamente para evitar estrés hídrico, la siembra se hizo periódicamente cada 15 días para evitar desabastecimiento, estos plantones fueron utilizados en la aclimatación de insectos y en el ensayo.



*Fig. 11.* Siembra de semillas de Sacha Inchi para alimentación de insectos. A. Semillas pre germinadas de Sacha Inchi. B. Siembra de semilla pre germinada de Sacha Inchi en macetas de 1 kg con suelo estéril. C. Plantas de Sacha Inchi.

✓ **Colecta y adaptación de *Syphrea* sp en jaulas de aclimatación en vivero**

Se colectaron insectos (imagos) de *Syphrea* sp de diversas parcelas de Sacha Inchi en tubos Falcon con tapa rosca, 20 adultos por cada frasco. Los individuos recolectados en campo fueron mantenidos en observación por un período de 30 días, antes de iniciar los bioensayos (Rivera y Pinto, 2011).



Fig. 12. Colecta y adaptación de *Syphrea* sp. A. Adultos de *Syphrea* sp defoliando hojas de Sacha Inchi. B. Capturando adultos de *Syphrea* sp en tubos Falcon en campo. C Adultos de *Syphrea* sp adaptándose en jaulas de aclimatación con plantones de Sacha Inchi.

✓ **Formulación de concentraciones de esporas y aplicación de *B. bassiana* a *Syphrea* sp en jaulas de aclimatación**

Se pesó 50 g de arroz esporulado de *Beauveria bassiana* producido en sustrato de arroz y se agregó Tween 0,1% obteniendo una solución madre, se dejó reposar por 5 horas, para lograr la humectación del hongo, se llevó a la cámara de Newbauer para el conteo de conídias y se hizo diluciones para obtener las dosis a aplicar.

Se formularon 3 dosis a aplicar  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  conídias/ml + Tween 20, los *Syphrea* sp fueron infectadas por aspersión durante dos minutos con las suspensiones de los tratamientos en concentración de conídias/ml en un envase transparente y en el testigo con solución de Tween 20 al 0,1%/sin conidios, siguiendo la metodología del ensayo de virulencia (Nussenbaum, 2014).

La aplicación de las dosis formuladas sobre adultos de *Syphrea* sp se realizó con un aspersor, el volumen asperjado por tratamiento y testigo fue de 2 ml de suspensión.

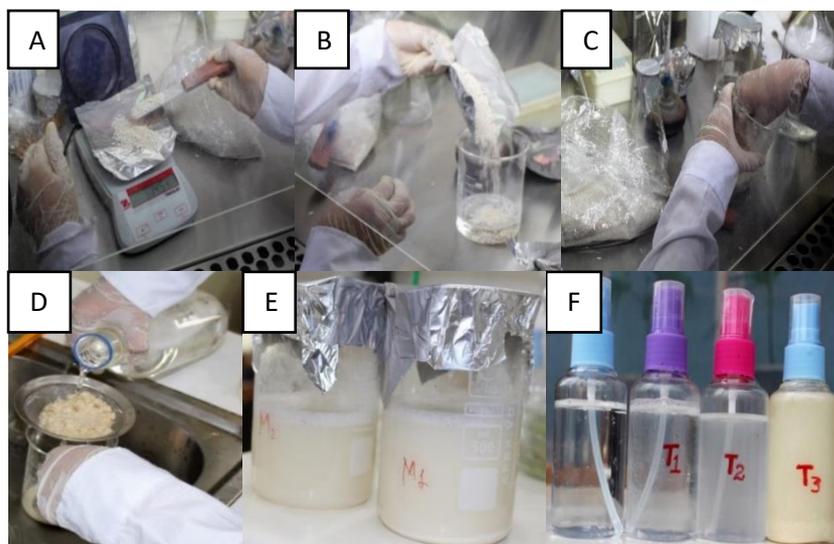


Fig. 13. Formulaciones de concentraciones de esporas. A. Pesado de 50 g de *Beauveria bassiana* en sustrato de arroz. B. Sustrato de arroz con ADE + Tween 0,1%. C. Liberación de esporas. D. Lavado del sustrato de arroz con ADE utilizando un colador para obtener la solución madre. E. Solución madre. F. Aspersores llenos con cada concentración de acuerdo a los tratamientos.

Los adultos de *Syphrea* sp infectados fueron colocadas en jaulas forradas con tela organza, con dimensiones de 60 cm de ancho x 40 cm de largo x 60 cm de altura, cada una con puerta y seguro. Cada jaula contendrá en su interior 2 plantones de sachá inchi como fuente de alimento por una semana, luego se cambiaron hasta completar los días de evaluación, estas fueron remojadas diariamente para evitar estrés hídrico. Las jaulas se colocaron en el vivero bajo condiciones controladas de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad relativa ( $80 \pm 5\%$ ) (Rivera y Pinto, 2011).

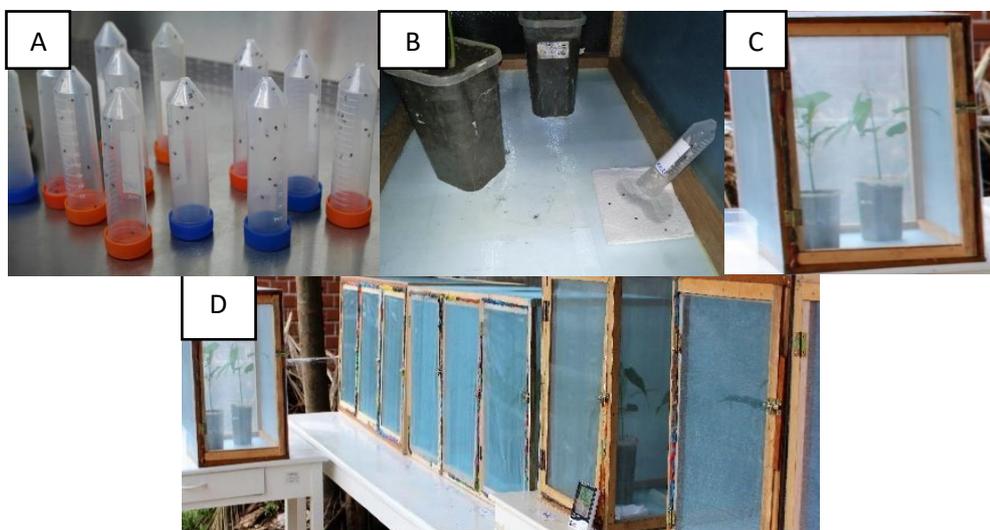


Fig. 14. Aplicación de *B. bassiana* a *Syphrea* sp en jaulas de aclimatación. A. Tubos Falcon conteniendo adultos de *Syphrea* sp capturados de jaulas de aclimatación. B. Liberación de insectos asperjados de acuerdo a los tratamientos establecidos. C. Jaulas conteniendo insectos y plantones de Sachá Inchi listos para su evaluación. D. Distribución de jaulas con su respectivo tratamientos y repetición en forma aleatoria.

### ✓ Evaluación de mortalidad de *Syphrea* sp

Diariamente se llevó un registro de la mortalidad de los insectos durante 15 días por cada tratamiento en estudio, el número de *Syphrea* sp vivos y muertos. Se aceptó una mortalidad en el testigo hasta del 10% (tres insectos) (Nussenbaum, 2013, Rivera y Pinto, 2011).

Los *Syphrea* sp muertos fueron extraídos de las jaulas de recría, llevadas al laboratorio, desinfectadas con una solución de NaClO al 1%, se enjuagaron tres veces con ADE, luego fueron colocadas individualmente en placas Petri acondicionadas como cámara húmeda estéril, se colocó ADE y cuadro portaobjetos en cruz, para promover el crecimiento del micelio y confirmar la muerte por infección del hongo. Se selló la placa con parafilm y se dejó encubar para su posterior observación en el estereoscopio. Con la información obtenida se determinó el porcentaje de mortalidad. Del mismo modo, se llevó registro de la temperatura y la Humedad Relativa utilizando el higrómetro (Jaramillo, 2012).

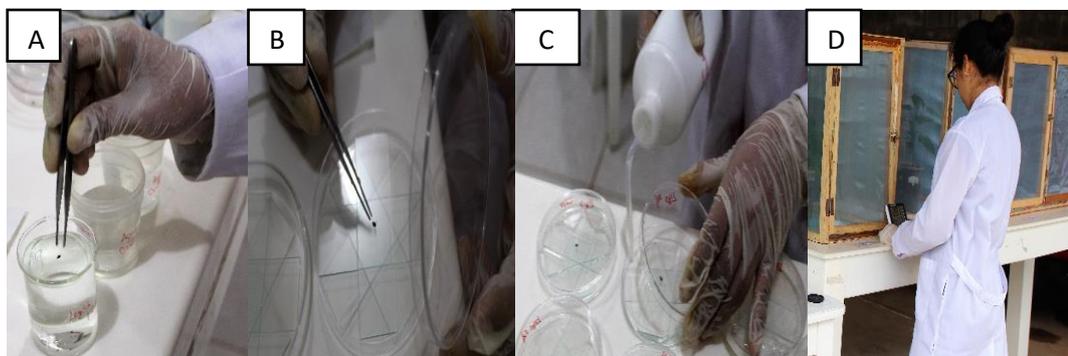
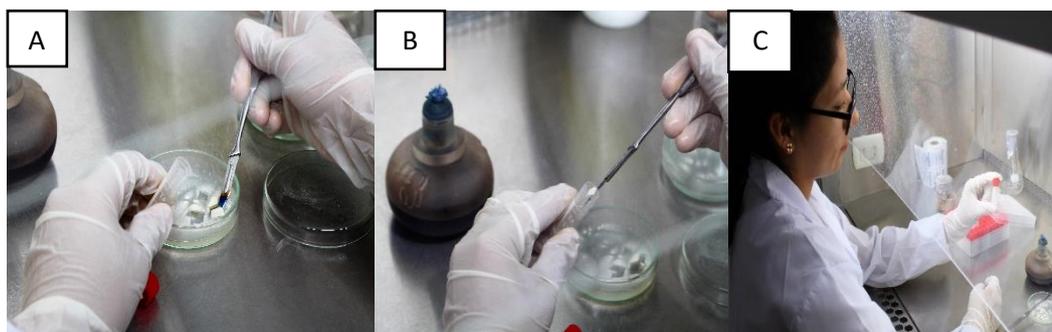


Fig. 15. Evaluación de mortalidad de *Syphrea* sp . A. Desinfección de adultos de *Syphrea* sp en solución de NaClO al 1%, durante 2 minutos. B. *Syphrea* sp en cámaras húmedas. C. Agregando ADE a la placa Petri para proporcionar humedad al hongo y lograr su esporulación. D. Tomando datos de temperatura y Humedad Relativa utilizando el higrómetro.

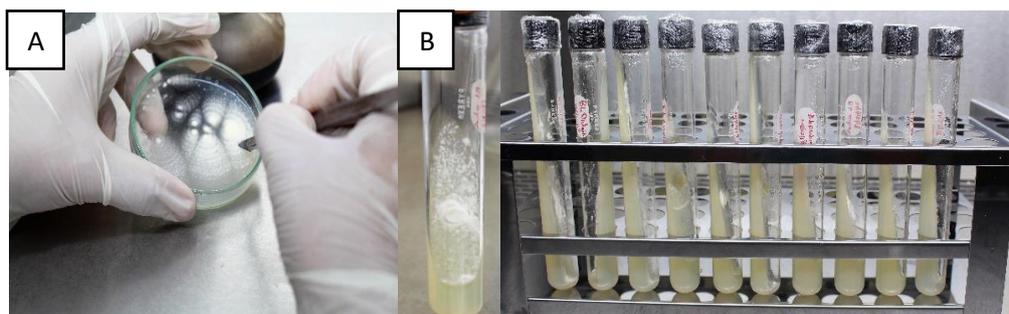
### ✓ Conservación de *Beauveria bassiana* en Glicerina al 20% y en tubos con medio PSA

La cepa nativa se conservó en Glicerina al 20%, anotándose el código, la fecha y se guardó en refrigeración en el laboratorio dentro del cepario de conservación. Se escogió la placa que contenía el hongo mejor esporulado y buen crecimiento, con el fin de en mantenerlos viables, eliminando la necesidad de repiques frecuentes (Fernández, 2004, CATIE, 2010, Senasa,2014 e ICT, 2016).



*Fig. 16.* Conservación de *B. bassiana* en Silica Gel. A. Realizando cortes de estructuras del hongo en medio PDA. B. Incorporando los segmentos extraídos de la placa en medio PDA en los viales con sílica Gel. C. Vial con sílica Gel con segmentos de estructura del hongo listo para conservar en refrigeración.

La conservación en tubos con medio de cultivo, se realizó seleccionando una placa con el hongo bien esporulado, se cortó un segmento y se colocó en el centro del tubo, se cerró el tubo con la tapa rosca y se selló con parafilm. Una vez desarrollado el hongo se guardaron en refrigeración a temperatura de 4° C, asegurando de esta forma una conservación hasta por un año, en que se realizará el pase a nuevos tubos, si se observa que el medio se ha secado (Fernández, 2004; CATIE, 2010, Senasa, 2014 e ICT, 2016).



*Fig. 17.* Conservación de *B. bassiana* en tubos con medio PSA. A. Realizando el corte de segmentos del hongo en medio PSA. B. Tubos con tapa rosca sellados con parafilm presentando esporulación.

## 2.2. Variables o características evaluadas

### 2.2.1. Mortalidad

La mortalidad se registró diariamente después del segundo día de haber instalado el experimento. El porcentaje de mortalidad se calculó mediante la siguiente fórmula según SENASA:

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

En donde:

P<sub>i</sub> = Población inicial

P<sub>f</sub> = Población final

La mortalidad se corrigió utilizando la fórmula de Abbot:

$$\text{Mortalidad Corregida} = \frac{\%MT - \%Mt}{100 - \%Mt} \times 100$$

En donde:

MT = Mortalidad en el Tratamiento

Mt = Mortalidad en el testigo

### **2.2.2. Tiempo de mortalidad de insecto**

Con los datos de mortalidad diaria se estimó el tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>), el tiempo letal 90 (TL<sub>90</sub>) y el tiempo promedio de mortalidad.

### **2.2.3. Tiempo de aparición del micelio sobre el insecto**

Los “cadáveres” se sacaron, se colocaron en cámara húmeda con el fin de obtener esporulación, y observar las etapas del proceso infectivo, contando desde el día de la muerte hasta la aparición del micelio.

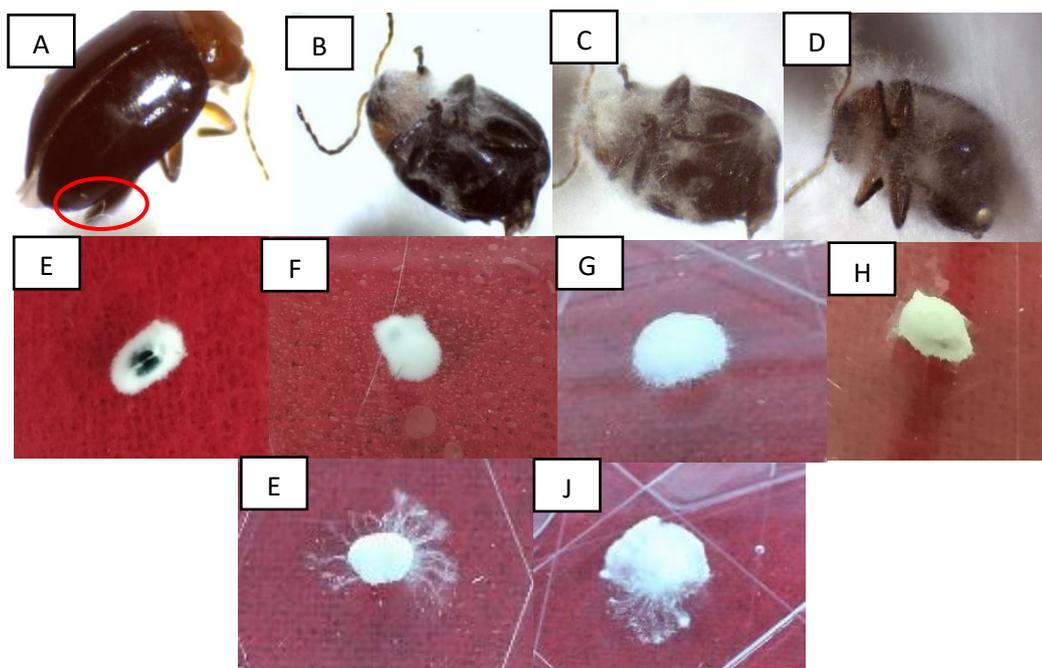


Fig. 18. Observación de las etapas del proceso infeccioso (inicio, cubrimiento y esporulación) de *B. bassiana* sobre *Syphrea* sp. A. Inicio del micelio B. Cubrimiento de micelio sobre el pronoto del insecto. C. Expansión del micelio hacia el cuerpo del insecto. D. Cubierta parcial del cuerpo del insecto. E. Cubierta generalizada del cuerpo del insecto. F. Formación de esporas. G. Esporulación. H. Esporulación completa lista para diseminación. I. Crecimiento hifal del hongo. J. Expansión del micelio, después de haber sido esporulada completamente.

### 2.3. Diseño de investigación

El trabajo de investigación fue de tipo experimental, donde se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), con 3 tratamientos y 3 repeticiones cada uno, cada repetición tuvo 20 insectos, considerando 1 testigo  $T_0$  con la misma cantidad de repeticiones e insectos acondicionados.

Tratamientos en estudio:

$T_0$	Agua + Tween 20 al 1%
$T_1$	<i>Beauveria bassiana</i> $1 \times 10^5$ conidios/ml + Tween 20
$T_2$	<i>Beauveria bassiana</i> $1 \times 10^7$ conidios/ml + Tween 20
$T_3$	<i>Beauveria bassiana</i> $1 \times 10^9$ conidios/ml + Tween 20

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Resultados

##### 3.1.1. Control de calidad

**TABLA 1:** Control de calidad de *Beauveria bassiana* en sustrato de arroz

Producto	Conteo de esporas g/ml	Viabilidad (%)			Pureza (%)
		16 horas	18 horas	20 horas	
<i>Beauveria bassiana</i>	2,08 x 10 <sup>9</sup>	65,18	78,21	94,79	100

En la Tabla 1, nos muestra el resultado obtenido en el control de calidad que nos permitió determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso, la viabilidad del hongo y en combinación con el estimativo del número de esporas, calcular la cantidad de esporas viables de una formulación por unidad de peso, estableciendo la proporción del agente biológico en la formulación e identificación de los contaminantes (Bhanu; Padmaja; Kiran, 2008) obteniéndose concentración de  $2,08 \times 10^9$  esporas g/ml similar a los resultados obtenidos por Carreño 2003, que fue de  $2 \times 10^9$  y mayor a los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.*, 2017 con producción de  $3,15 \times 10^8$  esporas g/ml, igualmente Sahayaraj y Namasivayam, 2008 obtuvieron producción de  $11,76 \times 10^8$  esporas g/ml, con porcentaje de germinación a las 16 horas de 65,18; a las 18 horas un 78, 21 %, alcanzando un porcentaje de viabilidad de 94,78 % a las 20 horas después de haberse sembrado en placas con PSA, mostrando una pureza del 100%.

Considerándose un producto de buena viabilidad y pureza, pues el resultado del porcentaje de germinación es superior al 90 % tal como lo indica el ICT, 2016 y Senasa, 2014, estos los resultados se corroboran con los obtenidos por Hernández; Pérez, y Toledo (2010) que obtuvieron  $\geq 90\%$  de germinación y Bastidas *et al.*, 2009 quienes obtuvieron porcentaje de germinación de  $89,50\% \pm 5,08$ . Además, una formulación comercial debe tener germinación superior al 85% en tiempo de incubación de 24 horas, ya que al asperjar en el campo el hongo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto período de exposición a condiciones ambientales (Sahayaraj y Namasivayam, 2008).

### 3.1.2. Porcentaje de mortalidad

**TABLA 2:** ANVA para el porcentaje de mortalidad de *Syphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Sig
<b>Modelo</b>	141,58	3	47,19	113,27	<0,0001	**
<b>Tratamientos</b>	141,58	3	47,19	113,27	<0,0001	**
<b>Error</b>	3,33	8	0,42			
<b>Total</b>	144,92	11				

**CV: 10,33    R<sup>2</sup>: 0,98**

En la Tabla 2, el ANVA, nos muestra, una alta significancia entre tratamientos, con un R<sup>2</sup> de 98% y un CV de 10,33 %. En la Figura 19, nos muestra la diferencia entre tratamientos, siendo el T3 el que alcanzó la mayor mortalidad (86,11%) y una mortalidad corregida (84,85%) mostrando diferencia significativa frente a todos los tratamientos, con un promedio de mortalidad de (11,3) días. Reportándose así, un aislado nativo altamente virulento contra *Beauveria bassiana*. Al respecto, Cárdenas, Villalba, Bustillo, Montoya, Góngora (2007), reportaron porcentajes de mortalidad de *H. hampei* de 73,3 a 100%, a los 8 días de evaluación, por acción de *B. bassiana*. En cambio, Gil (2017) al evaluar la efectividad de *Beauveria bassiana* para el control del gorgojo del banano *Cosmopolites sordidus* con adultos traídos de campo capturados a través de trampas, con una concentración 1,76 x 10<sup>9</sup> conidias/mL + Adherente conidias/g presentó mortalidad de 82,72%, ambos trabajos bajo condiciones de laboratorio.

Estos resultados difieren con Góngora, Marín y Benavides (2009) investigadores de Cenicafé, quienes en busca de cepas de mejor virulencia estudiaron 11 cepas nativas siendo la cepa Bb 9205 la que presentó 89,1% de mortalidad en adultos de broca del café a una concentración de 1x10<sup>6</sup> esporas/ml con brocas de cría de laboratorio.

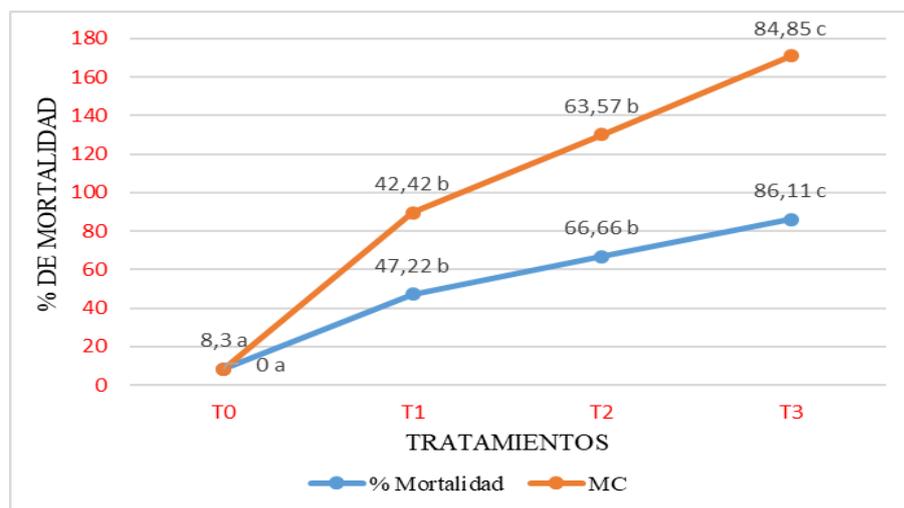


Fig. 19. Porcentaje de mortalidad de *Slyphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*. Letras distintas indican diferencias significativas. DUNCAN ( $p \leq 0,01$ ).

### 3.1.3. Tiempo Letal 50 de Mortalidad (TL<sub>50</sub>)

**TABLA 3:** ANVA para el Tiempo Letal 50 de mortalidad de *Slyphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*, expresado en días

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Sig
<b>Modelo</b>	118,00	3	39,33	118,00	<0,0001	**
<b>Tratamientos</b>	118,00	3	39,33	118,00	<0,0001	**
<b>Error</b>	2,67	8	0,33			
<b>Total</b>	120,67	11				

**CV: 10,83      R<sup>2</sup>: 0,98**

En la Tabla 3, el ANVA, nos muestra, una alta significancia entre tratamientos, con un R<sup>2</sup> de 98% y un CV de 10,83 %. En la Figura 20, nos muestra variabilidad numérica entre tratamientos en cuanto al tiempo requerido para matar al 50% de la población tratada. El tratamiento que requirió el menor TL<sub>50</sub> fue el T3 con (6,3) días, estos resultados son similares a los reportados por Suárez y Mejía (2012), quienes reportaron aislamientos de *B. bassiana* con TL<sub>50</sub> sobre *H. hampei* de (7) días, utilizando una concentración  $1 \times 10^9$  conidios/ml.

Estos resultados no son congruentes con Cárdenas *et al.* (2007) que reporta haber logrado el menor TL<sub>50</sub> sobre *H. hampei* en 3 días, debido al tiempo de evaluación, la especie trabajada, y a la selección de aislamientos nativos utilizados. Asimismo, Gil (2017) alcanzó un Tiempo Letal medio a 9,74 días con una concentración  $1,76 \times$

$10^9$  conidias/mL + Adherente conidias/g. Suárez (2009) alcanzó a una concentración  $1 \times 10^6$ , un  $TL_{50}$  a los 6 días; y con la concentración de  $1 \times 10^9$  tuvo un  $TL_{50}$  a los 10 días con 77,50 de mortalidad.

Lo que indica que *B. bassiana* a una concentración de  $1 \times 10^9$  conidios/ml tiene una buena velocidad en lograr el  $TL_{50}$ , lo que puede indicar una mayor adaptabilidad genética de la cepa al ambiente del ensayo, adaptándose mejor en comparación a la temperatura de origen donde se aislaron la cepa del ensayo.

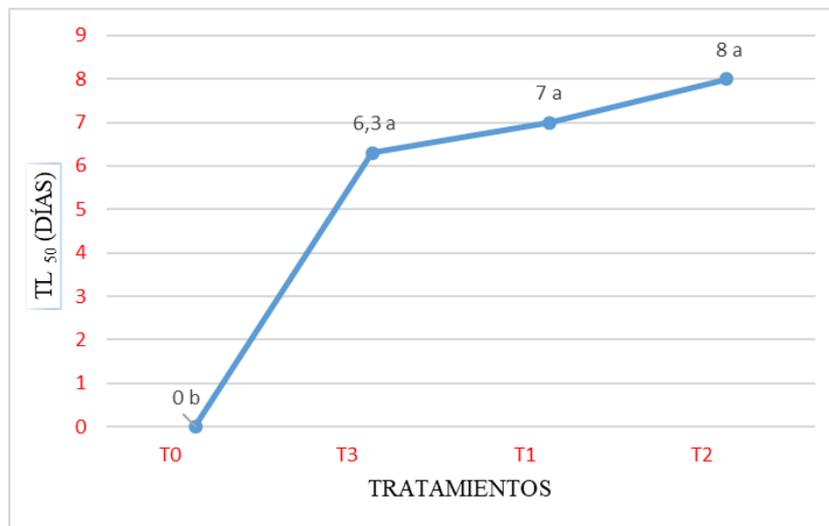


Fig. 20. Tiempo Letal 50 de mortalidad de *Syphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*. Letras iguales no indican diferencias significativas.

### 3.1.4. Tiempo Letal 90 de Mortalidad (TL<sub>90</sub>)

**TABLA 4:** ANVA para el Tiempo Letal 90 de mortalidad de *Syphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*, expresado en días

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Sig
<b>Modelo</b>	242,25	3	80,75	323,00	<0,0001	**
<b>Tratamientos</b>	242,25	3	80,75	323,00	<0,0001	**
<b>Error</b>	2,00	8	0,25			
<b>Total</b>	244,25	11				

**CV: 6,45    R<sup>2</sup>: 0,99**

En el Tabla 4, el ANVA, nos muestra, una alta significancia entre tratamientos, con un R<sup>2</sup> de 99% y un CV de 6,45 %. En la Figura 22, nos muestra variabilidad numérica entre tratamientos en cuanto al tiempo requerido para matar al 90% de la población tratada. Siendo el T2 y T3 los que alcanzaron el mejor TL<sub>90</sub>, con un promedio de (10) días, en

comparación con Suárez y Mejía (2012) quienes obtuvieron el mejor  $TL_{90}$ , a los (3,8). Bastidas *et al.* (2009) obtuvieron porcentaje similar para alcanzar el 90% de la mortalidad de *H. hampei*, con (4,4) y (5,4 días) respectivamente, debido a que utilizaron mezclas de coadyuvantes en sus formulaciones y la especie trabajada es distinta.

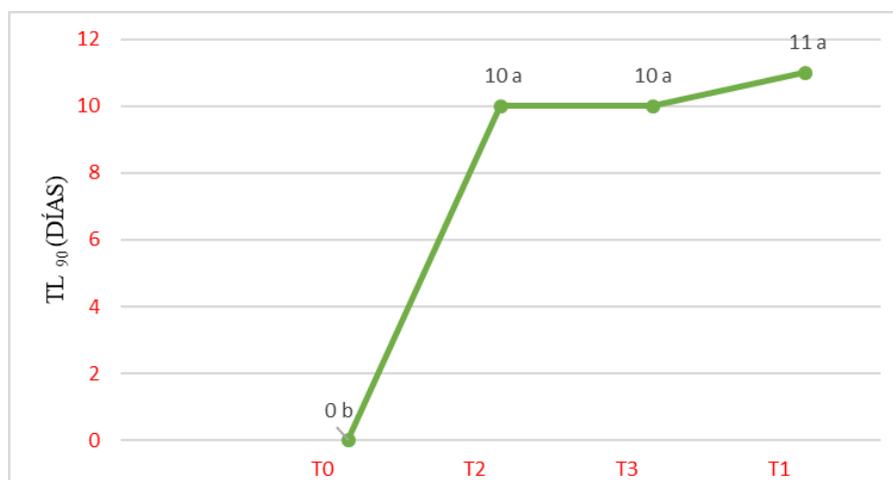


Fig. 21. Tiempo Letal 90 de mortalidad de *Syphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*. Letras iguales no indican diferencias significativas. DUNCAN ( $p \leq 0,01$ ).

### 3.1.5. Tiempo de aparición del micelio

**TABLA 5:** ANVA para el Tiempo de aparición del micelio sobre *Syphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*, expresado en días

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Sig
<b>Modelo</b>	6,27	3	2,09	132	<0,0001	**
<b>Tratamiento</b>	6,27	3	2,09	132	<0,0001	**
<b>Error</b>	0,13	8	0,02			
<b>Total</b>	6,4	11				

**CV: 10,63 R<sup>2</sup>: 0,98**

En la Tabla 5, el ANVA, nos muestra, una alta significancia entre tratamientos, con un  $R^2$  de 98% y un CV de 10,63 %. En la Figura 22, nos muestra diferencia significativa frente a los demás tratamientos, siendo el T3 el que alcanzó en menor tiempo (1,2) días, y el cubrimiento total del cuerpo entre los 4 y 5 días, reportándose datos similares por Malpartida, Narrea y Dale (2013) quienes observaron crecimiento micelial entre el entre el segundo y tercer día, y cubrieron totalmente el cuerpo al cuarto día observándose la aparición de conidios. La producción temprana de gran número de esporas sobre el

cadáver de insectos puede facilitar mayor diseminación de la enfermedad sobre sus poblaciones. *B. bassiana* requieren una humedad relativa de 90% Giraldo, 2009, Senasa, 2014, y temperaturas entre 23 y 28 °C Batista, 1989, siendo la Humedad relativa durante la investigación de 74,5 y 80, 1%, y de Temperatura fue de 26,6 a 27,6 °C, las que favorecieron la germinación a través de la formación del tubo germinativo iniciando la penetración en la cutícula del crisomélido fitófago, involucrando este proceso a diversos mecanismos enzimáticos y procesos físicos. Las enzimas que participan en la penetración son proteasas, quitinasas y lipasas que actúan de forma secuencial, degradando la cutícula y liberando nutrientes para el hongo, el tiempo de penetración es de 8 a 12 horas, en esta etapa se activa el sistema inmune del insecto a través de los procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento, el hongo para evadir la respuesta inmune del insecto suelen prescindir de la formación de pared celular y se desarrollan como protoplastos, evadiendo su reconocimiento por los hemocitos circulantes en el hemocele.

El hongo entomopatógeno entra en la fase de colonización agotando los nutrientes y el agua presente su interior, ocurriendo la muerte del hospedante, producto de la necrosis el cadáver se torna oscuro, se deshidrata y momifica. Luego ocurre la fase saprofítica consumiendo todo el material orgánico presente en el interior del insecto y termina en una fase de crecimiento micelial hacia el exterior. Las hifas emergen de los cadáveres de insectos a través de la boca, ano, apéndices y aberturas genitales que concluye con la producción de nuevas unidades reproductivas (conidios) sobre la superficie cubriendo el cuerpo del crisomélido (Figura 18). Todos los síntomas y signo observados y descritos en los grupos problema no se observaron en el grupo control (Monzón 2001, Giraldo, 2009, Cañedo, 2004, Senasa, 2014). Del mismo modo, Vuelta *et al.* (2017), menciona que, si *H. hampei* se contamina con *B. bassiana*, muere después de 3 o 6 días en condiciones de humedad saturada y dura hasta 9 días si las condiciones de humedad relativa son del 70 al 80 %.

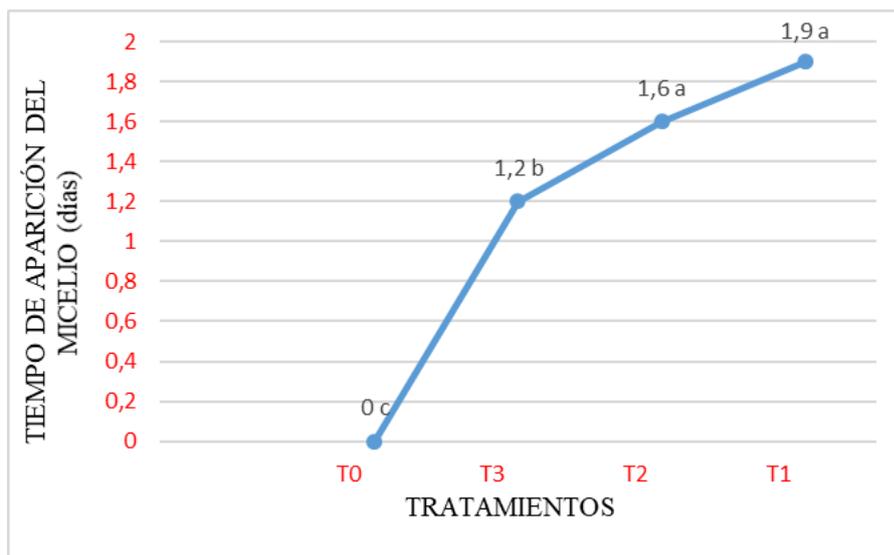


Fig. 22. Tiempo de aparición del micelio sobre *Syphrea* sp inoculados con *Beauveria bassiana*. Letras distintas indican diferencias significativas.

El crisomélido fitófago masticador (*Syphrea* sp) fue reportado por Vecco (2009) quien menciona que pertenece al Orden: Coleoptera, Familia: Crisomelidae, Tribu: Alticini, Género: *Syphrea* sp ; lo cual no es congruente con el Servicio de Sanidad Nacional de Sanidad Agraria (Senasa) quien reporta la identificación del crisomélido con fecha 04 de Julio del 2018 como Orden: Coleoptera, Familia: Crisomelidae, Tribu: Alticini, Género: *Asphaera luntrans*, por lo cual se recomienda realizar un análisis molecular del espécimen en posteriores trabajos de investigación.

## CONCLUSIONES

- ✓ La cepa nativa de *Beauveria bassiana*, producida en sustrato arroz, presenta una concentración  $2,08 \times 10^9$  esporas g/ml, con porcentaje de viabilidad del 94,78 %, mostrando pureza del 100%.
- ✓ Las concentraciones  $1 \times 10^7$  conidios/ml (T2) y  $1 \times 10^9$  conidios/ml (T3) presentaron los porcentajes de mortalidad corregida sobre adultos de *Syphrea* sp de 63,57 % y 84,85 % respectivamente, ya que, por tratarse de una cepa nativa de la región, está adaptada a las condiciones climáticas por lo que esta cepa, puede ser una alternativa para el control de esta plaga.
- ✓ La concentración  $1 \times 10^9$  conidios/ml (T3), presentó el mejor TL<sub>50</sub> en la población de *Syphrea* sp, en menor tiempo con (6,3) días, en cambio, el mejor TL<sub>90</sub> de la población de *Syphrea* sp lo presentaron los tratamientos T2 y T3 con (10) días.
- ✓ La concentración  $1 \times 10^9$  conidios/ml (T3) alcanzó en menor tiempo de esporulación del hongo (1,2 días), en cámaras húmedas.

## RECOMENDACIONES

- Criar *Syphrea* sp en Laboratorio (Módulos de crianza) para obtener insectos adultos homogéneos en peso, edad.
- Implementar un estudio de investigación para identificar cepas nativas de *Beauveria bassiana* en diferentes especímenes.
- Realizar estudios de investigación en plantaciones de Sacha Inchi, a nivel de campo, usando cepas nativas de *Beauveria bassiana* y comparar resultados con este trabajo de investigación.
- Realizar identificación molecular del crisomélido fitófago en trabajos posteriores de investigación, debido a que en su identificación hubo discrepancia, no hay género ni especie definida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alatorre, R. (2000). Hongos entomopatógenos, In: Memorias de artículos en resumen y en extenso, XI Curso Nacional, Control Biológico 2000, Guanajuato, México, Pág, 123-134.
- Alves, S. 1998. Controle microbiano de insetos. 2ª Ed. Brasil.
- Anteparra, M., Berrios, M., Granados, L., Díaz, W. (2014). ALGUNOS INSECTOS FITÓFAGOS ASOCIADOS EL CULTIVO DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) EN EL DISTRITO DE CHINCHAO, HUÁNUCO.
- Archuleta-Torres, A, García-Gutiérrez, C., Vázquez-Montoya. N. y López-Aguilar, C. (2010) PATOGENICIDAD DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* SOBRE LA Mosca de los estigmas del maíz *Euxesta stigmatias* (Loew) CIIDIR COFAA-IPN Unidad Sinaloa Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa.
- Ávila, N. (2004). Inocuidad alimentaria y Control biológico de plagas y enfermedades de hortalizas con énfasis en control biológico, Cd, Delicias, Chihuahua, México, 39-43 pp.
- Barajas, C., Morales, M., Del pozo, E., Rodríguez, M., y Núñez, J. (2009). Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero.
- Barron, G. (2001). George Barron's Website on Fungi, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá. Consultado 27 de noviembre 2005. Disponible en: <http://www.uogelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>
- Bastidas, A., Velásquez, E., Marín, P., Benavides, P., Bustillo, E., Orozco, F (2009). Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café, Agronomía 17 (1): 44-61.
- Batista, A. (1989). Controle biológico e o manejo integrado de pragas. Biológico. V. 55, p 36-39.
- Biaggioni, R., Michereff, M., Tigano, M., Oliveira, P., Lema, E., Fancelli, M. y Padilha, J. (2011). Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. Bulletin of insectology. 64: 201-208.
- Bischoff, J., Rehner, S., Humber, R. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage, Mycologia, 101(4): 512-530.

- Bhanu, G., Padmaja, V., Kiran, S. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation, *Bioresource Technol*, 99: 1530-1537.
- Bhattacharryya, B., Baruah, A., Purnima, D., Bhuyan, U. (2008). Field efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Moniliales) against white grubs in Assam, *Journal of Biological Control* 22 (1): 81-64.
- Cachique, D. (2006). Estudio de la Biología Floral y Reproductiva del Sacha Inchi *Plukenetia volubilis* L, Universidad Nacional de San Martín, Facultad de Ciencias Agrarias, Tarapoto – San Martín – Perú
- Cárdenas, R., Villalba, G., Bustillo, P., Montoya, R., Góngora, B. (2007). Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café, *Cenicafé* 58 (4): 293-303.
- Carreño, A. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Basicas Microbiología Agrícola Veterinaria Bogotá, d, C, Colombia.
- Carrillo, L. (2005). Los hongos de los alimentos y forrajes. Estructuras. Universidad Nacional de Salta. Facultad de Ciencias Agrarias. Consultado 27 de noviembre 2005. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>
- Castillo, A., Meneses, H., Santander, A., Santander, G., González, E., Cásares, R. y Márquez, Y. 2006. Universidad Central de Venezuela Facultad de Agronomía Instituto de Química Y Tecnología Laboratorio de Bioensayos para Moscas de la Fruta (Lamofru) Producción artesanal de *Beauveria bassiana*.
- CATIE (2010). Producción y uso de hongos entomopatógenos. Programa CATIE/MIP-AF. Fundación para el desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA)
- Cañedo, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos, Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.
- CIED (2008). Protocolo del Cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Sub proyecto: Adaptación y validación participativa de paquete tecnológico para la producción

- competitiva del Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la cuenca del Perené. Centro de Investigación, Educación y Desarrollo (CIED) Selva Central, La Merced – Perú.
- Cortez, M. (2010). Evaluación de aislamientos de hongos entomopatógenos y su virulencia hacia *Bactericera cockerelli*, según su origen. *Fitopatología Colombiana* 34 (1): 17-21.
- Edafon (2005). Fundación Agroecológica. Consultado 26 noviembre 2005. Disponible en: <http://www.controlbiologico.com/bassianil.htm>
- Fernández, V. (2004). Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad. Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana Cuba, 10 p.
- Flores, A. (2009). Sacha Inchi. Red peruana de alimentación y nutrición. Lima-Perú.
- Galluser, S. (2005). Identificación de Muestras Botánicas del Género *Plukenetia* (Euphorbiaceae). Informe de Consultaría AMC N° 012- 2004/ INIA- E,E, POV/ CEP, Tarapoto.
- Gerónimo J., Torres de la cruz, M., De la Cruz, M., De la Cruz, A., Ortiz, C., Cappello, S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 42 (1): 28-35. Enero-Junio 2016, ISSN 0120-0488.
- Gil, J. (2017). Evaluación de dos cepas de *Beauveria bassiana* (Báls.) y una cepa de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de adultos del gorgojo del banano, *Cosmopolites sordidus* (Coleóptera, Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio. Universidad Privada Antenor Orrego, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma.
- Giraldo, J. (2009). Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Universidad del Tolima. Artículo de divulgación, *Revista Ganadero*. Tolima, Colombia. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/uso-hongos-entomopatogenos-controlt2540/p0.htm>
- Goettel, M., Eilenberg J., Glare, T. (2005). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, eds, Elsevier: *Comprehensive Molecular Insect Science*, 6: 361– 406.

- Godoy, J., Valera, R., Guédez, C., Cañizalez, I., Castillo, C. (2007). Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *B. bassiana*. Revista de la Facultad de Agronomía 24 (3): 415-425.
- Góngora, C., Marín, P. y Benavides, P. (2009). Claves para el éxito de del Hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la Broca del café. CENICAFE, Gerencia Técnica, Programa de Investigación Científica, Junio, 2009.
- Gómez, R.H., Soberanis, R.W., Teorio, C. M. y Torres, A.E. (2011). Manual de producción y uso de hongos antagonistas – Laboratorio de Antagonistas SCB-SENASA-PERU.
- Gómez, P. y Mendoza, J. (2004). Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*, Centro de Investigación de la Caña De Azúcar del Ecuador- CINCAE, Publicación técnica no, 5.
- Hernández, O., Pérez, N., Toledo, J. (2010). Patogenicidad de Tres Cepas de Hongos Entomopatógenos a Adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de Laboratorio. Acta Zool, Mex, (n.s.),26(3): 481-494,2.
- Humber, R. A. and R. S. Soper. 1986. USDA-ARS collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of strains. Plant Protection Research unit, cornell university.
- ICT (2016). Manual de producción masiva y formulación de hongos entomopatógenos y antagonistas.
- Iskandarov, U., Guzalova, A., Davranov, K. (2006). Effects of Nutrient Medium Composition and Temperature on the Germination of conidia and the entomopathogenic Activity of the Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*,
- INIEA – SUDIRGEB – EEA, “El Porvenir” (2005). Cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) EEA – El Porvenir, San Martín – Perú.
- Jaramillo, J. (2012). Evaluación y validación de mezclas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para el control de la broca del café en frutos infestados caídos al suelo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias – Entomología, Medellín, Colombia.
- Kouassi, M. (2001). Les possibilites de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Universidad de Québec, Montreal,

- Canada. Vertigo. La revista en ciencias ambientales de la web. 2. (2). Consultado 27 de noviembre 2005. Disponible en: [http://www.vertigo.uqam.ca/.../mathias\\_de\\_kouassi.htm](http://www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.htm)
- Lopatin, I.K. (1984). Leaf beetles (Chrysomelidae) of Central Asia and Kazakhtan. Amerind Publ. Co. New Delhi, India. 416 p.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers, Annual Review of Entomology, 46: 667-702.
- Manco, E. (2005). Situación y Avances del cultivo de Sacha Inchi en el Perú, Dirección Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología.
- Manco, E. (2006). Cultivo de sachá inchi, INIEA – SUDIRGEB – Estación Experimental Agraria “EL PORVENIR”, Tarapoto, San Martín – Perú.
- Marín, P. y Bustillo, A. (2002). Pruebas microbiológicas y físico-químicas para el control de calidad de hongos entomopatógenos. Memorias del Curso Internacional Teórico – Práctico sobre Entomopatógenos, Parasitoides y otros Enemigos de la Broca del Café. CENICAFE, Chinchiná, Colombia, marzo 11 al 15 del 2002, 72-116.
- Monzón, A. (2001). Producción, Uso y Control de Calidad de Hongos Entomopatógenos en Nicaragua, Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).
- Monzón, A. (2009). Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos, CATIE, Nicaragua.
- Motta, P. y Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas, Ambiente y Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, vol, 6, núm, 2, 2011, pp, 77-90 Universidade de Taubaté Taubaté, Brasil.
- Nussenbaum, A. (2014). Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodnero, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.
- Patiño, T. (2011). Fitopatología general - Glosario, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de Ica.
- Pariona, N., Castellanos, P y León, E. (2007). Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp sobre *Schistocerca piceifrons* peruviana (Lynch Arribalzaga, 1903) Rev. Peru. biol. 14(2): 253-257. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.

- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G., Luangsa, J.J., Devotto, L., Humber, R.A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*, *Mycologia*, 103 (5): 1055– 1073.
- Pilco, B. (2001). Determinación de la acción del hongo entomopatógeno a la broca del café (*Hipotenemus hampei*), en la región San Martín.
- Rivera, G. y Pinto, L. (2011). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) - Fundación Centro de Biotecnología Mariano Ospina Pérez, Bogotá.
- Rios, R. (2007). Control del gorgojo *Cosmopolites sordidus* y *Metamasius hemipterus* en plátano con hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* spp. en San Martín. UNSM. OINV. 6: 28-38.
- Roberts, D. and Yendol, W. Use of fungi for microbial control of insects, In microbial control, Academic Press p, 125-149.
- Rodríguez, L., Gandarilla, F., Maldonado, M., Quintero, I., Morales, H., Alfaro, J. y Elías, M. (2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, (Hypocreales: Cordycipitaceae) en cultivo Bifásico.
- Sandino, D. (2003). Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar. Nicaragua, FUNICA/UNA/CATIE, 26p.
- Shah, P y Pell, K (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Sahayaraj, K. y Namasivayam, S. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products, *Afr, J, Biotechnol*, 7: 1907-1910.
- SENASA (2014). Manual de producción y Uso de Hongos Entomopatógenos. Laboratorio de Entomopatógenos SCB – SENASA, Lima-Perú.
- Sosa, D., Alves, S. (2000). Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 29(3):515-521.
- Suárez, G. (2009). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) plaga de maíz almacenado. *Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*. Santa Marta, Colombia.

- Suárez, G. y Mejía, J. (2012). Manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) con *Beauveria bassiana* en cafetales de Pueblo Bello (Cesar). Revista Colombiana de Microbiología Tropical 2 (2): 41-50.
- Tito, P y Bautista, E. (2009). Estrategias de comercialización de Sacha inchi, Gestión en el Tercer Milenio. revista de Investigación de la Facultad de Ciencias Administrativas. UNMSM, lima, Vol. 12 (23), pp. 37 – 49.
- Torres, A., García, C., Vazquez, A. y López, C. (2009). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* sobre la mosca de los estigmas del maíz *Euxesta stigmatias* (Loew). CIIDIR COFAA-IPN Unidad Sinaloa Blvd, Juan de Dios Bátiz Paredes No, 250, Guasave, Sinaloa.
- Vecco, C. (2015). Manejo agroecológico de plagas del Sacha Inchik (*Plukenetia volubilis* L.) a partir del estudio de la diversidad asociada de organismos y sus relaciones en San Martín, Perú. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical Alejandro De Humboldt. República de Cuba. La Habana.
- Vecco, C, Pinedo, R., Fernández, M y Cave, R. (2009). Análisis funcional del nicho ecológico de *Crisomelido* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae) asociado a *Plukenetia volubilis* L. (Euphorbiales: Euphorbiaceae) en la Amazonia peruana. Ceiba Volumen 50(1).
- Vélez, P., González, G., Valderrama, F., Estrada, V., Bustillo, P., Montoya, R. (2000). Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*, Cenicafé, 51 (3): 196-206.
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M., Maniania, N., Monzon, A., Ownley, B., Pell, J., Rangel, D., Roy, H. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology, Fungal Ecology, 2: 149-159.
- Vuelta, D., Rizo, L. y Basilé, R. (2017). Evaluación del efecto del hongo *Beauveria bassiana*, trampas y el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en el control de la broca del café (*Hypothenemus Hampei*) en las yaguas.
- Wong, H. (2003). Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 147 p.

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Plantas defoliadas obtenidas de las jaulas de aclimatación de insectos



adultos.

**Anexo 2.** Datos obtenidos de las condiciones ambientales presentadas en el experimento.

Días de evaluación	Humedad Relativa (%)		Temperatura (°C)	
	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde
1	84	80	26,4	26,7
2	82	76	28,4	27,7
3	80	77	26,8	27,2
4	84	64	26,2	30,7
5	79	65	27,4	30,5
6	84	78	26,7	26,2
7	82	75	25,3	27,2
8	67	76	28,6	27,2
9	82	78	26,3	27,3
10	82	70	25,8	28,2
11	76	75	27,4	26,8
12	75	76	27,9	27,6
13	84	81	24,8	26,8
14	80	71	25,5	26,9
15	80	76	26,1	26,8
<b>Promedios</b>	<b>80,1</b>	<b>74,5</b>	<b>26,6</b>	<b>27,6</b>

**Metodología de multiplicación de hongos**

La utilización de productos a base de hongos entomopatógenos, implica una serie de acciones las cuales van a determinar la obtención de productos biológicos de alta eficiencia en la reducción de las plagas para las cuales se están utilizando. Para la obtención de estos productos biológicos se requiere producir estos hongos entomopatógenos, el cual consiste en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (conídias) en un sustrato natural. A la fecha se han evaluado diferentes sustratos como arroz, trigo, cebada, maíz, fríjol y soya, siendo los que más

se utilizan el arroz y el maíz. Existen varias metodologías para la producción masiva de hongos entomopatógenos como la producción industrial, producción semi-industrial y producción artesanal (Senasa, 2014, CATIE,2010).

### **Producción Artesanal**

La multiplicación artesanal se inicia con un cultivo puro al que se le denomina "hongo patrón" o "semilla" (Castillo *et al.*, 2006).

- Localización de micelios de *B. bassiana* en cerezas de café (sustrato natural).
- Aislamiento, purificación de la cepa y valoración de la calidad: viabilidad, patogenicidad y concentración (nº conidias/g).
- Preparación del medio de cultivo (50g de arroz + 60 mL de agua)
- Esterilización del medio de cultivo a través de un “baño maría” a 98°C por 40min.
- Siembra del hongo en el medio esterilizado
- Maduración del hongo. Temp: 25-27°C por 15 días. Confirmación de identidad de la cepa
- Almacenamiento de las botellas contentivas del hongo desarrollado a temp. ambiente, los 10 primeros días para uso mediato. De no utilizarlo, resguardar en un refrigerador a 5°C
- Cosecha del hongo

### **Producción Semi- Artesanal**

La producción semi-industrial se realiza en varias fases, que van desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto. El proceso consta de dos etapas, cepario y producción masiva (Senasa, 2014).

1. Cepario. La etapa de cepario comprende:

- Aislamiento del hongo
- Obtención del cultivo puro
- Obtención de nuevas cepas
- Mantenimiento
- Reactivación
- Conservación de cepas
- Control de calidad

2. Producción. La etapa de producción comprende:

- Preparación de medio líquido
- Inoculación e incubación de medio líquido
- Preparación del sustrato
- Inoculación e incubación del sustrato
- Proceso de secado
- Conservación
- Control de calidad

### **Producción Masiva**

La producción masiva de los hongos entomopatógenos se realiza en dos métodos: uno en bolsas y otro en bandejas. En ambos métodos es secado para su comercialización. La concentración de esporas o conidias es 10 veces más que por el método en bandeja que el de bolsa. El método de bandeja solo es aplicado para *B. bassiana* y *M. anisopliae*, salvo mejor parecer del laboratorio de producir estas especies por el método en bolsa. Ambos procesos se realizan en dos fases (Senasa, 2014):

#### **Primera Fase**

- Preparación del medio líquido
- Inoculación e incubación del medio líquido

#### **Segunda fase**

##### **Método de producción en bolsas**

- Preparación del sustrato
- Inoculación del sustrato con el medio líquido
- Incubación del sustrato
- Secado del producto final

##### **Método de producción en bandejas (*B. bassiana* y *M. anisopliae*)**

En este proceso la germinación y desarrollo vegetativo del hongo se realiza en las bolsas y el proceso de colonización y esporulación se realiza en bandejas (Senasa, 2014).

- Preparación de medio Líquido
- Inoculación e incubación del medio líquido.
- Preparación del sustrato.
- Inoculación del sustrato
- Incubación
- Secado del hongo entomopatógeno
- Extracción de conídias
- Cosecha del hongo entomopatógeno seco
- Conservación del hongo entomopatógeno o producto final
- Control de Calidad

### **Sustratos de multiplicación de hongos**

Para producir *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma harzianum* se propone sustratos alternativos al arroz (cuadro 01). Los sustratos deben ser pesados en bolsas de polipropileno de 11x16 pulgadas de acuerdo a la proporción indicada y luego agregar el agua o la solución enriquecedora como levadura de cerveza, melaza de caña, carbonato de calcio y urea a razón de 8, 30, 4.5 y 2 g/litro respectivamente, engrapar las bolsas en el borde superior y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión por 45 minutos (ICT, 2016).

**Anexo 3.** Sustratos de multiplicación de hongos (ICT, 2016).

<b>HONGO</b>	<b>SUSTRATO</b>	<b>PROPORCIÓN DE SUSTRATO (%)</b>	<b>SOLUCIÓN</b>	<b>ml/g SUSTRATO</b>
<i>B. bassiana</i>	Cascarilla de arroz molida + Arroz	15:85	Agua	0,5
<i>B. bassiana</i>	Cascarilla de arroz entera + Ñelen	15:85	Levadura de cerveza	0,5
<i>L. lecanii</i>	Coronta de maíz molida + Ñelen	50:50	agua	0,5
<i>L. lecanii</i>	Ñelen	50:50	Melaza de caña	0,25
<i>M. anisopliae</i>	Cascarilla de arroz molida + Ñelen	50:50	Agua	0,5
<i>M. anisopliae</i>	Cáscara de maní + Ñelen	50:50	Agua	0,8
<i>M. anisopliae</i>	Cáscara de maní + Ñelen	50:50	Carbonato de calcio	0,8
<i>T. harzianum</i>	Cascarilla de arroz entera + Ñelen	50:50	Agua	0,5
<i>T. harzianum</i>	Cascarilla de arroz molida + Ñelen	50:50	Agua	0,5
<i>T. harzianum</i>	Cáscara de maní + Ñelen	50:50	Agua	0,8
<i>T. harzianum</i>	Cascarilla de arroz entera + Ñelen	50:50	Carbonato de calcio	0,5
<i>T. harzianum</i>	Cascarilla de arroz entera + Ñelen	50:50	Melaza de caña	0,5
<i>T. harzianum</i>	Cáscara de maní + Ñelen	50:50	Melaza de caña	0,5
<i>T. harzianum</i>	Cascarilla de arroz entera + Ñelen	50:50	Urea	0,5
<i>T. harzianum</i>	Cascarilla de arroz molida + Ñelen	50:50	Urea	0,5

<i>T.</i> <i>harzianu</i> <i>m</i>	Coronta de maíz molida + Ñelen	50:50	Urea	0,5
<i>T.</i> <i>harzianu</i> <i>m</i>	Cáscara de maní + Ñelen	50:50	Urea	0,8



Ministerio  
del Ambiente

Instituto de  
Investigaciones de la  
Amazonia Peruana - IIAP

## Reporte de Identificación de hongo entomopatógeno nativo del cultivo de sacha inchi

En el marco del Proyecto "Mejoramiento del Servicio de Competitividad de la Cadena de Valor de Sacha Inchi a los Productores en cuatro Provincias de la Región San Martín"; se colectó un hongo entomopatógeno parasitando Chrysomélidos en plantas de sacha inchi. Después de realizar el reaislamiento del hongo en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) se procedió a la identificación, concluyendo:

Que El Hongo aislado del insecto es *Beauveria bassiana*.

Se realizó la producción del hongo usando como sustrato arroz y el control de calidad indica lo siguiente:

Producto	N° esporas g/sustrato	Viabilidad (%)			Pureza (%)
		16 horas	18 horas	20 horas	
<i>Beauveria bassiana</i> en sustrato arroz	2 x 10 <sup>9</sup>	65,18	78,21	94,79	100

Se expide el presente documento para los fines que el interesado crea conveniente.

Morales, 22 de Junio del 2018

Atentamente;



Ing. M. Sc. Kadir J. Márquez Dávila



**OFICINA**  
Av. José Abelardo Quiñónez km 2.5  
Teléfs. (065) 263451 - 263461 - 265515 - 265516  
Apto. 784 - Iquitos  
E-mail: [preside@iiap.org.pe](mailto:preside@iiap.org.pe)  
IQUITOS - PERU

**OFICINA SAN MARTÍN**  
Jr. Belén Torres de Tello N° 135  
Morales  
Teléfs. (042) 524748 / 525979  
E-mail: [iiapism@iiap.org.pe](mailto:iiapism@iiap.org.pe)  
SAN MARTÍN - PERU

**OFICINA DE COORDINACIÓN**  
Av. Larco 930, Of. 501  
Miraflores  
Telefax: (0051-1) 4460960 - 4445763  
E-mail: [iiapli@iiap.org.pe](mailto:iiapli@iiap.org.pe)  
LIMA - PERU



MINISTERIO DE AGRICULTURA

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA  
CENTRO DE DIAGNÓSTICO DE SANIDAD VEGETAL

Av. La Molina Nº 1915, Lima 12 - Perú  
Teléfono directo: 313- 3303  
Central telefónica 313- 3300 Anexos: 1400 - 1401  
Pag. Web: www.senasa.gob.pe

Ministerio de Agricultura  
**SENASA**  
Servicio Nacional de Sanidad Agraria  
**PERU**

Pag. 1 de 1

<b>1. Información del solicitante:</b>			<b>Nº de Solicitud: 104253 - 2018</b>
Nombre: RIMACHI VALLE MARILYN			
Dirección: SAN MARTIN - Alto Biavo / Bellavista / San Martin			
Nº Expediente:		Origen Material Vegetal: LOCAL	
<b>2. Información de la Actividad</b>			
Componente: SISTEMA DE VIGILANCIA FITOSANITARIA 2012-2018			
Producto: Vigilancia Fitosanitaria de plagas presentes			
<b>3. Fecha de Recepción de la muestra:</b>		<b>Procedencia de la muestra:</b>	<b>País:</b>
09/05/2018 11:44		Pinto Recodo / Lamas / San Martin	PERU
<b>4. Cultivo:</b>			
Nombre Científico: <i>Plukenetia volubilis</i>		Cultivar: SACHA INCHI	
Nombre Común: Sacha Inchi			

**5. Resultado por Método de Ensayo:**

<b>ENTOMOLOGIA</b>	<b>Código Muestra:</b> 201810425301000	<b>Tipo:</b> ESPECIMEN	<b>Cantidad:</b> 8Unds
--------------------	--	------------------------	------------------------

MET-UCDSV/Ent-001 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE INSECTOS CON USO DE PREPARACIONES NO MICROSCÓPICAS

Fecha de Recepción : 09/05/2018

Fecha de Término: 18/05/2018

Nº	Resultado	Información
1	Positivo a la presencia de	(CHRYSOMELIDAE: ALTICINI)

Nº de Informe

Nº de Solicitud

**Consideraciones:**

Los tiempos de duración del servicio están expresados en días hábiles y son contabilizados a partir de la fecha de recepción de la muestra en el Laboratorio hasta la fecha de emisión del resultado

Los tiempos de duración del servicio pueden aumentar de acuerdo a la cantidad de muestras que solicite procesar el usuario, en cuyo caso se concordará el plazo al momento de efectuarse el contrato

REG-UCDSV-003 del PRO-UCDSV-003, vigente.

NOTA: El Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal sólo se responsabiliza por los resultados emitidos de la muestra indicada en el punto 4 del presente Informe

Fecha y Hora: 23/05/2018 11:47

<b>6. Muestreo:</b> No Aplica	
<b>7. Información adicional:</b>	
<b>Lugar y Fecha:</b>	 <p>MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA OFICINA DE LOS CENTROS DE DIAGNÓSTICO Y PRODUCCIÓN</p> <p><i>J. Tanaka</i> Ing. Jorge Tanaka Nakamacho Director del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal</p>
La Molina, de del	
<b>Nombre y Firma del Director (Sello oficial)</b>	



SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA  
CENTRO DE DIAGNÓSTICO DE SANIDAD VEGETAL

Av. La Molina N° 1915, Lima 12 - Perú  
Teléfono directo: 313- 3303  
Central telefónica 313- 3300 Anexos: 1400 - 1401  
Pag. Web: www.senasa.gob.pe



Pag. 1 de 1

**INFORME DE ENSAYO N° 105561 - 2018 - AG-SENASA-OCDP-UCDSV**

- 1. Información del solicitante:** **N° de Solicitud: 104253 - 2018**  
 Nombre: RIMACHI VALLE MARILYN  
 Dirección: SAN MARTIN - Alto Biavo / Bellavista / San Martin  
 N° Expediente: **Origen Material Vegetal: LOCAL**
- 2. Información de la Actividad**  
 Componente: SISTEMA DE VIGILANCIA FITOSANITARIA 2012-2018  
 Producto: Vigilancia Fitosanitaria de plagas presentes
- 3. Fecha de Recepción de la muestra:** **Procedencia de la muestra:** **País:**  
 09/05/2018 11:44 Pinto Recodo / Lamas / San Martin PERU
- 4. Cultivo:**  
 Nombre Científico: *Plukenetia volubilis*  
 Nombre Común: Sacha Inchi Cultivar: SACHA INCHI

**5. Resultado por Método de Ensayo:**

**ENTOMOLOGIA** **Código Muestra:** 201810425301000 **Tipo:** ESPECIMEN **Cantidad:** 8Unds

**MET-UCDSV/Ent-001** IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE INSECTOS CON USO DE PREPARACIONES NO MICROSCÓPICAS

**Fecha de Recepción :** 09/05/2018

**Fecha de Término:** 18/05/2018

N°	Resultado	Información
1	Positivo a la presencia de	<i>Asphaera lustrans</i> (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

N° de Informe



N° de Solicitud



**6. Muestreo:** No Aplica

**7. Información adicional:**

**Lugar y Fecha:**

La Molina, 04 de Julio del 2018



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA  
OFICINA DE LOS CENTROS DE DIAGNÓSTICO Y PRODUCCIÓN

*George Yanaka Nakamacho*  
Ing. George Yanaka Nakamacho  
Director del Centro de Diagnóstico  
de Sanidad Vegetal

**Nombre y Firma del Director (Sello oficial)**

**Consideraciones:**

Los tiempos de duración del servicio están expresados en días hábiles y son contabilizados a partir de la fecha de recepción de la muestra en el Laboratorio hasta la fecha de emisión del resultado

Los tiempos de duración del servicio pueden aumentar de acuerdo a la cantidad de muestras que solicite procesar el usuario, en cuyo caso se concordará el plazo al momento de efectuarse el contrato

REG-UCDSV-003 del PRO-UCDSV-003, vigente.

**NOTA:** El Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal sólo se responsabiliza por los resultados emitidos de la muestra indicada en el punto 4 del presente Informe

Fecha y Hora: 18/07/2018 16:51